

# **Neue antibiotische Sekundärmetabolite aus dem Myxobakterium *Stigmatella erecta***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Carolin Anke Eva Lewark  
aus Lehrte

1. Referentin:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Prof. Dr. Ursula M. Bilitewski

Prof. Dr. Ludger Beerhues

30.10.2013

07.01.2014

Druckjahr 2014

# **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit der Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Tagungsbeiträge**

Lewark, C., Wetzel, R., Jansen, R., Sasse, F., Bilitewski, U. New compounds active against tuberculosis. (Poster) MiCom 2011 – 2<sup>nd</sup> International Student Conference on Microbial Communication, Jena (2011).

Lewark, C., Wetzel, R., Hinkelmann, B., Jansen, R., Sasse, F., Bilitewski, U. New antibiotic secondary metabolites from the myxobacterium *Stigmatella erecta*. (Poster) 8<sup>th</sup> Status Seminar Chemical Biology, Frankfurt am Main (2013).

## Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *Staphylococcus aureus* ist einer der häufigsten Verursacher von nosokomialen und ambulant assoziierten Infektionen weltweit. Besonders problematisch ist hierbei das Auftreten neuer resistenter Stämme, die eine Behandlung erschweren. Daher besteht ein kontinuierlicher Bedarf an neuen Antibiotika mit alternativen Wirkmechanismen und Zielstrukturen.

Myxobakterien produzieren eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten mit teilweise antibiotischen Eigenschaften und sind daher eine potentielle Quelle für neue Antibiotika. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Sekundärmetabolite Stigmachronon 6 und 8 sowie Stigmareson 7 und 19 aus dem Myxobakterium *Stigmatella erecta* auf ihre antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* und ihre zytotoxische Wirkung auf Säugetierzellen untersucht. Die Verbindungen wurden unter der Bezeichnung „Stigate“ zusammengefasst.

Es stellte sich heraus, dass Stigate stark zytotoxisch und somit nicht als neue Wirkstoffkandidaten geeignet sind. Außerdem traten schnell resistente *S. aureus* Stämme auf. Da die Substanzen eine neue Stoffgruppe darstellen, sollte der Wirkmechanismus bzw. die Zielstruktur der Stigate dennoch näher untersucht werden. So weisen sämtliche Stigate eine funktionelle Nitro-Gruppe auf, die deren biologische Aktivität bewirkt. Des Weiteren ist das Target der Stigate nicht mit dem Target von Methicillin identisch, welches Enzyme der Peptidoglykan-Biosynthese inhibiert. Für das schnelle Auftreten resistenter Stämme ist vermutlich eine transkriptionell regulierte und Efflux-basierte Exkretion des Wirkstoffes verantwortlich.

Darüberhinaus zeigten die Stigate eine depolarisierende Wirkung auf das mitochondriale Membranpotential der humanen A549 und HUVEC Zellen, wobei der Effekt auf die A549 Zellen reversibel war. Zusätzlich konnte eine Verlangsamung des Zellzyklus der A549 Zellen beobachtet werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Zellproliferation und dem Mevalonat-Biosyntheseweg konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Dafür ergab ein Vergleich der Stigate mit den *S. erecta* Sekundärmetaboliten Aurachin und Stigmatellin eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit. Diese Verbindungen hemmen Komplex I bzw. III der respiratorischen Elektronentransportkette. Somit könnten eventuell auch die Stigate einen Komplex der Atmungskette inhibieren. Außerdem besteht aufgrund der negativen Ladung der Nitro-Gruppe sowie hydrophober Eigenschaften der Stigate die Möglichkeit einer Funktion als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Daher bleibt zu beweisen, dass die Zielstruktur und der Wirkmechanismus der Stigate innerhalb der mitochondrialen und bakteriellen Atmungskette zu finden sind.

## Summary

The human pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* is one of the most common agents of nosocomial and community acquired infections worldwide. Especially the rising incidence of new resistant strains causes severe problems in treating infections. Hence, there is an increasing need for novel antibiotics with different targets and modes of action.

Myxobacteria produce a variety of secondary metabolites partly with antibiotic characteristics and thus are a potential source for new antibiotics. Therefore, the aim of this thesis was to analyse the secondary metabolites Stigmachronon 6 and 8 as well as Stigmareson 7 and 19 from the myxobacterial species *Stigmatella erecta* regarding their antibacterial properties against *S. aureus* and cytotoxic characteristics on mammalian cells. The compounds were summarized as “Stigate” in this thesis.

It turned out that Stigate were strong cytotoxic on mammalian cells, so these substances were not suitable as new antibiotic candidates. Besides, rapidly emerging resistant *S. aureus* strains against the Stigate were observed. However as these compounds constitute a new substance group, the mode of action and target of Stigate were further analysed. All Stigate possess a functional nitro group, which is responsible for the biological activity of these compounds. Furthermore, the target of the Stigate is not identical with the target of Methicillin, which inhibits enzymes of the peptidoglykan biosynthesis. The rapid appearance of resistant strains is possibly due to a transcriptional regulated and efflux mediated excretion of the substance.

Additionally, the Stigate had a depolarizing effect on the mitochondrial membrane potential of human A549 and HUVEC cells, while the effect on A549 cells was recognized as being reversible. Moreover, the cell cycle of A549 cells was slowed down. Based on these results, a potential link between cell proliferation and the mevalonate pathway could not be proved. Instead, a comparison between Stigate and the secondary metabolites Aurachin and Stigmatellin from *S. erecta* showed structural similarities. These compounds inhibit complexes I and III of the respiratory electron transport chain. Hence for the Stigate this indicates a possible function as inhibitors of a complex of the respiratory chain. Besides, the negative charge of the nitro group and hydrophobic characteristics of the Stigate imply a function in uncoupling the oxidative phosphorylation. With respect to these findings, it has to be demonstrated that target and mode of action of the Stigate are related to the mitochondrial and bacterial respiratory chain.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 Die Entdeckung von <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.2 Morphologie und Genom	2
1.1.3 Kohlenstoff-Metabolismus	4
1.1.4 Zellatmung	6
1.1.5 Klinische Relevanz	7
1.1.6 Virulenzfaktoren	8
1.1.7 Andere <i>Staphylococcus</i> Spezies	10
1.2 Antibiotika	12
1.2.1 Die Entwicklung von Antibiotika im historischen Kontext	12
1.2.2 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen	13
1.2.3 Antibiotikaklassen	15
1.2.4 Neue Antibiotika	21
1.2.5 Myxobakterielle Sekundärmetabolite	22
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	24
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1 Materialien	26
2.1.1 Stämme und Säugetierzellen	26
2.1.2 Naturstoffe	26
2.1.3 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial	27
2.1.4 Lösungen und Puffer	27
2.1.5 Kit-Systeme zur Analyse von Säugetierzellen	30
2.1.6 Software	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Arbeiten unter sterilen Bedingungen	31
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	31
2.2.3 Gentechnische Methoden	34
2.2.4 HPLC-Analyse von Metaboliten im Kulturüberstand	38
2.2.5 Chemische Methoden	39
2.2.6 Kultivierung von Säugetierzellen	40
2.2.7 Analyse der Zytotoxizität	42
2.2.8 Zellzyklusanalytik	45

2.2.9 Nachweis von Cholesterin mithilfe von Filipin III .....	49
2.2.10 Proteinanalytik .....	51
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
3.1 Therapeutischer Index: Bakterielle Wachstumstests und Zytotoxizitätsanalysen mit Stigmaten .....	56
3.1.1 Die Stigmate besitzen eine andere Wirkung als das $\beta$ -Laktam Antibiotikum Methicillin auf <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
3.1.2 Die Stigmate inhibieren das <i>Staphylococcus aureus</i> Wachstum stammunabhängig in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich .....	58
3.1.3 Stigmachronon 8 wirkt bakterizid auf das klinische MRSA-Isolat .....	60
3.1.4 Resistenzentwicklung von <i>Staphylococcus aureus</i> gegen die Stigmate .....	61
3.1.5 Zytotoxizität der Stigmate auf Säugetierzellen .....	63
3.1.6 Minimale inhibitorische Konzentration der Stigmate auf <i>Staphylococcus aureus</i> und Säugetierzellen .....	65
3.2 Aufklärung des Wirkmechanismus und Identifizierung des Targets .....	67
3.2.1 Die funktionelle Nitro-Gruppe von Stigmachronon 8 bewirkt dessen biologische Aktivität auf <i>Staphylococcus aureus</i> und Säugetierzellen .....	67
3.2.2 Einfluss der Stigmate auf das Membranpotential von tierischen Mitochondrien .....	71
3.2.3 Einfluss der Stigmate auf den tierischen Zellzyklus .....	78
3.2.4 Einfluss der Stigmate auf den Mevalonat Syntheseweg in Säugetierzellen und <i>Staphylococcus aureus</i> .....	91
3.2.5 Einfluss der Stigmate auf die tierische AMP-aktivierte Proteinkinase .....	104
3.2.6 Das hypothetische <i>Staphylococcus aureus</i> Protein SAOUHSC_02659 codiert für einen Tetrazyklin Repressor .....	113
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>122</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>144</b>
<b>Anhang A .....</b>	<b>166</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	166
<b>Anhang B .....</b>	<b>171</b>
Verwendete Chemikalien .....	171
<b>Anhang C .....</b>	<b>173</b>
Verwendete Geräte .....	173
Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	175
<b>Danksagung .....</b>	<b>176</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

### 1.1.1 Die Entdeckung von *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wird den Kugelbakterien zugeordnet, die auch als Kokken bezeichnet werden (Abb. 1.1). Die Kokken wurden erstmalig von dem Mediziner Theodor Billroth beschrieben, der kettenbildende Bakterien in eitrigen Wunden beobachtet hatte (Billroth, 1874). Im Jahr 1878 erbrachte Robert Koch den Nachweis, dass Staphylokokken Erreger von Wundinfektionen sind (Schmitt, 1982). Kurze Zeit später, im Jahr 1880, hielt sein Konkurrent Louis Pasteur einen Vortrag, in dem er Bakterien für die Entstehung von Krankheiten verantwortlich machte (Pasteur, 1880). Unter anderem führte er das Furunkel als Beispiel an, bei dem es sich um eine tiefgehende Entzündung des Haarfollikels in der Haut handelt. Wie später bekannt wurde, ist in der Regel *S. aureus* der Auslöser dieser Erkrankung (Chiller *et al.*, 2001).

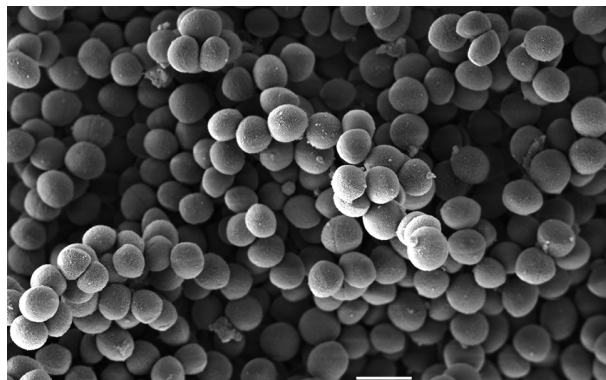


Abb. 1.1: *Staphylococcus aureus*. (REM-Aufnahme. Maßstab: 2 µm. Quelle: Norbert Bannert, Kazimierz Madela/ Robert Koch Institut)

Der Zahnarzt Alexander Ogston, der die Arbeit von Robert Koch weiterführte und sich mit der Isolierung von Mikroorganismen aus Abszessen beschäftigte, unterschied kurze Zeit später zwischen zwei Formen von Mikrokokken. Dabei handelte es sich um die kettenförmig wachsenden Streptokokken und die traubenartig wachsenden Staphylokokken. Auch erkannte Ogston, dass Mikrokokken ein Teil der normalen Flora der Haut sind und sie ihre Infektiösität erst durch Injektion in einen Organismus erlangen (Ogston, 1882).

Der Mikrobiologe Friedrich Julius Rosenbach differenzierte aufgrund der Pigmentierung erstmalig zwischen *Staphylococcus pyogenes albus* und *Staphylococcus pyogenes aureus*



(Rosenbach, 1884). Das Wort „*Staphylococcus*“ setzt sich aus den griechischen Wörtern „Staphyle“ [deutsch: Traube, Weinbeere] und „Kókkos“ [deutsch: Kern] zusammen. Der Name „*pyogenes*“ [deutsch: Eiter] hat seinen Ursprung ebenfalls im Griechischen. Die Bezeichnungen „*aureus*“ [deutsch: golden] und „*albus*“ [deutsch: weiss] stammen aus dem Lateinischen und wurde den Bakterien aufgrund der gelb-goldenen sowie weissen Pigmentierung der Kolonien verliehen.

Der spezifische Nachweis für *S. aureus* war der Koagulase-Test mit humanem Plasma (Cowan, 1939; Cadness-Graves *et al.*, 1943). Gelangt *S. aureus* bei einer Infektion in das Blutssystem, verursacht die Koagulase die Gerinnung von Fibrinogen, welches eine Kapsel um das Bakterium bildet und dadurch die Erkennung durch das Immunsystem des Wirts verhindert (Cohn und Morse, 1959). Erstmals wurde die Koagulase von Daranyi und Buzna mit Pathogenität in Verbindung gebracht (1926). Im Gegensatz zum koagulase-positiven *S. aureus* weisen andere, zumeist apathogene Staphylokokken nur selten eine Koagulase auf, was eine Unterscheidung dieser Spezies ermöglichte (Loeb, 1903; Much, 1908).

### 1.1.2 Morphologie und Genom

*S. aureus* subsp. *aureus* ist ein pathogenes, gram-positives, unbewegliches, kugelförmiges und fakultativ anaerobes Bakterium und gehört taxonomisch der Familie der Staphylococcaceae an (Darai *et al.*, 2012). Die Staphylokokken haben eine Größe von 0,8 -1,0 µm und sie reproduzieren sich über asexuelle binäre Spaltung in mehreren Teilungsebenen. Durch eine nicht vollständige Trennung der zwei Tochterzellen entstehen die für Staphylokokken charakteristischen traubenförmigen Anhäufungen (Madigan *et al.*, 2003). Die häufigsten natürlichen Habitate sind die Haut und die Schleimhaut der Atemwege von Warmblütern, wobei *S. aureus* nicht nur Menschen, sondern auch Tiere besiedelt und eine Vielzahl von Krankheiten auslösen kann (Kloos, 1980).

Es gibt zwei Subspezies von *S. aureus*, wobei es sich um das Humanpathogen *S. aureus* subsp. *aureus* (Rosenbach, 1884) und das an Schafe adaptierte Pathogen *S. aureus* subsp. *anaerobius* (de la Fuente *et al.*, 1985) handelt. Da die zweite Subspezies keine Relevanz für die Humanmedizin besitzt, wird im Allgemeinen *S. aureus* subsp. *aureus* mit *S. aureus* gleichgesetzt (Darai *et al.*, 2012).

Die äußere Hülle von *S. aureus* besteht aus einer Zellmembran sowie einer dicken, aber permeablen Zellwand. Die Zellwand von *S. aureus* besitzt im Prinzip den typischen Aufbau einer gram-positiven Zellwand (Giesbrecht *et al.*, 1998). Sie besteht zum großen Teil aus

Peptidoglykan sowie negativ geladenen Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren und aus einer weiteren Zahl an Proteinen, die *S. aureus* als Virulenzfaktoren dienen (Kap. 1.1.6).

Das Peptidoglykan-Rückgrat besteht aus einer Glykan-Kette von abwechselnden  $\beta$ -1-4-N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure Molekülen (Abb. 1.2). Darüberhinaus ist die N-Acetylmuraminsäure mit einem Stammpeptid verbunden. Die Glykan-Ketten werden über eine Bindung zwischen den zwei Stammpeptiden mit einer Pentaglycin-Kette miteinander verknüpft. Der Vorgang der Quervernetzung der Zellwand wird durch die Transpeptidasen, den Penicillin-bindenden Proteinen (PBP), katalysiert (Giesbrecht *et al.*, 1998).

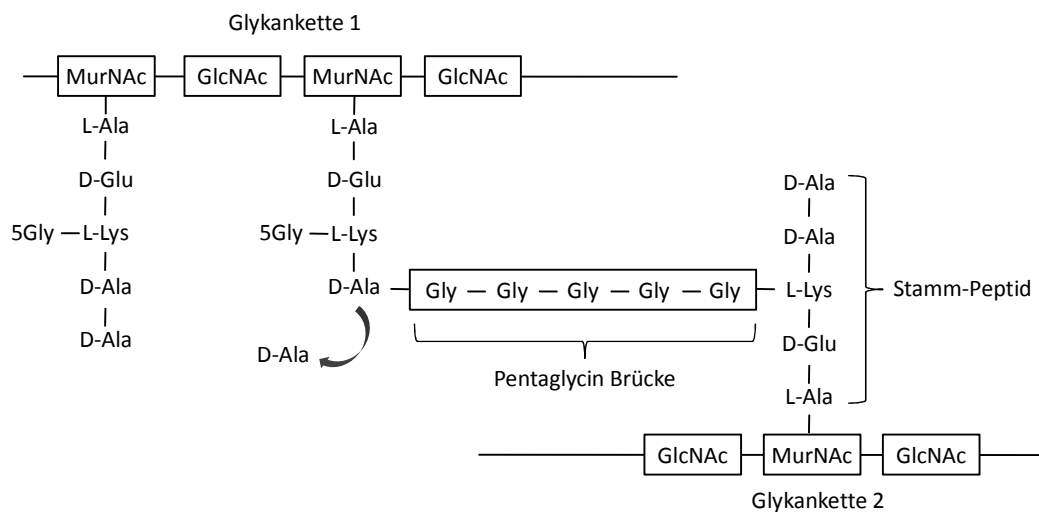


Abb. 1.2: Verlinkung zweier Glykanketten in der Peptidoglykanschicht der Zellwand von *S. aureus* im schematischen Überblick. Ein D-Ala Rest von einem Stammpeptid wird während der Transpeptidase Reaktion zur Erzeugung von Energie abgespalten, da außerhalb der Zellmembran kein ATP vorhanden ist (Madigan *et al.*, 2003). MurNAc: N-Acetylmuraminsäure; GlcNAc: N-Acetylglukosamin; Gly: Glycin (übernommen aus Stapleton und Taylor, 2002).

Die *S. aureus* Zellmembran besteht vorwiegend aus negativ geladenen Phospholipiden, wie Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin. Während die Zellmembran unter anderem zur selektiven Permeabilität beiträgt, bietet die Zellwand Schutz vor äußeren Faktoren (Van Bambeke *et al.*, 2008). Jedoch verhindert die Zellwand in der Regel nicht das Durchdringen von antimikrobiellen Stoffen. Die Zellwand gram-positiver Bakterien kann für Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis 57 kDa permeabel sein (Scherrer und Gerhardt, 1971). Kleine Moleküle wie Alkohole, Phenole oder Aldehyde können leicht die Zellwand überwinden (Russell, 1999). Auch für kleine geladene Moleküle stellt die negative Ladung der Zellwand kein Hindernis dar. Jedoch ist die Permeabilität der gram-positiven Zellwand vom Aufbau des Peptidoglykans abhängig, d.h. vom Grad der Quervernetzung und von der Länge der Glykan-Kette (Lambert, 2002). In der Regel ist bei gram-positiven Bakterien der

Aufbau der Zellwand nicht der Grund für Antibiotikaresistenzen. Vielmehr treten Mechanismen wie eine veränderte Zielstruktur sowie Abbau, Inaktivierung oder aktiver Efflux des Wirkstoffes am häufigsten auf (Kap. 1.2.2 ff; Russell, 1998).

Die erste vollständige Sequenz des *S. aureus* Genoms wurde 2001 veröffentlicht (Kuroda *et al.*, 2001). Das zirkuläre Genom von *S. aureus* ist 2,8 Mbp groß und hat einen geringen GC-Gehalt von ca. 33 %. Des Weiteren besitzt *S. aureus* eine Vielzahl an Plasmiden.

Im Genom von methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen wurden mehrere Gene identifiziert, die vermutlich durch Gentransfer von verschiedenen anderen bakteriellen Spezies erworben wurden. Dies deutet an, dass *S. aureus* sich schnell an veränderte Bedingungen adaptieren kann, indem bei Selektionsdruck umgehend passende Gene aufgenommen werden. Bei resistenten Stämmen ist die Mehrheit der Gene, die verschiedene Antibiotikaresistenzen vermitteln, auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert. Beispielsweise wurde bei methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen ein mobiles genetisches Element in Form einer chromosomalen Kasette gefunden, die unter anderem für das Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a) codiert. Bei den Penicillin-bindenden Proteinen (PBP) handelt es sich um Enzyme, die für die Zellwandsynthese von *S. aureus* benötigt werden. Im Gegensatz zu den ursprünglichen PBPs, besitzt PBP2a eine veränderte Struktur, an die Methicillin nicht binden kann (Kuroda *et al.*, 2001).

### 1.1.3 Kohlenstoff-Metabolismus

*S. aureus* besitzt die Fähigkeit, als Kohlenstoff-Quellen Glukose, Glutamat, Laktose, Maltose, Sukrose, Galaktose, Mannitol, Fruktose, Trehalose, Mannose, Ribose und Glycerin zu metabolisieren (Mah *et al.*, 1967; Hengstenberg *et al.*, 1968).

Zur Verstoffwechselung von Glukose kann *S. aureus* den Pentosephosphatweg und die Glykolyse nutzen (Abb. 1.3; Blumenthal, 1972). Das Endprodukt der Glykolyse ist Pyruvat. Ist kein Sauerstoff vorhanden, entsteht aus Pyruvat Lactat (Kendall *et al.*, 1930; Krebs, 1937). Unter aeroben Bedingungen wird dagegen Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA umgesetzt (Gardner und Lascelles, 1962). Aus Acetyl-CoA kann Acetylphosphat gebildet werden, welches in der Substratphosphorylierung zur Synthese von ATP und Acetat genutzt wird. Das gebildete Acetat wird anschließend ins Medium sekretiert (Somerville *et al.*, 2003).

Im Zitronensäurezyklus (Trikarbonsäurezyklus; TCA Zyklus) wird aus Acetyl-CoA und Oxalacetat enzymatisch Citrat gebildet, welches zur Gewinnung von Energie in Form von

GTP,  $\text{FADH}_2$  und  $\text{NADH}$  genutzt wird. (Somerville *et al.*, 2003). In gram-positiven Bakterien wird der Ablauf des TCA Zyklus reprimiert, solange schnell verwertbare Kohlenstoffquellen wie Glukose vorhanden sind. Ist die Glukose nahezu aufgebraucht, geht *S. aureus* in die postexponentielle Phase über, woraufhin Acetat wieder aufgenommen und in Form von Acetyl-CoA im dereprimierten TCA Zyklus katabolisiert wird (Somerville *et al.*, 2002). Vermutlich besitzt der TCA Zyklus eine wichtige Funktion in der Pathogenität von *S. aureus*, da in der postexponentiellen Phase nicht nur der TCA Zyklus wieder aufgenommen wird, sondern auch extrazelluläre Virulenzfaktoren produziert werden (Somerville *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass eine Inaktivierung des TCA Zyklus die postexponentielle Phase und den Acetat-Katabolismus verhindert und der Übergang in eine vorzeitige stationäre Phase stattfindet, welches mit einer reduzierten Produktion von Virulenzfaktoren gekoppelt ist (Somerville *et al.*, 2002).

Allerdings bilden einige *S. aureus* Stämme eine Ausnahme im Acetat Katabolismus. Somerville *et al.* wiesen nach, dass unter anderem der hier verwendete Laborstamm NCTC8325 zwar Acetat ins Medium abgibt, aber die Fähigkeit verloren hat, dieses später weiter zu metabolisieren (2003). Daher ist die Möglichkeit gegeben, dass dieser Stamm eine verminderte Virulenz aufweist.

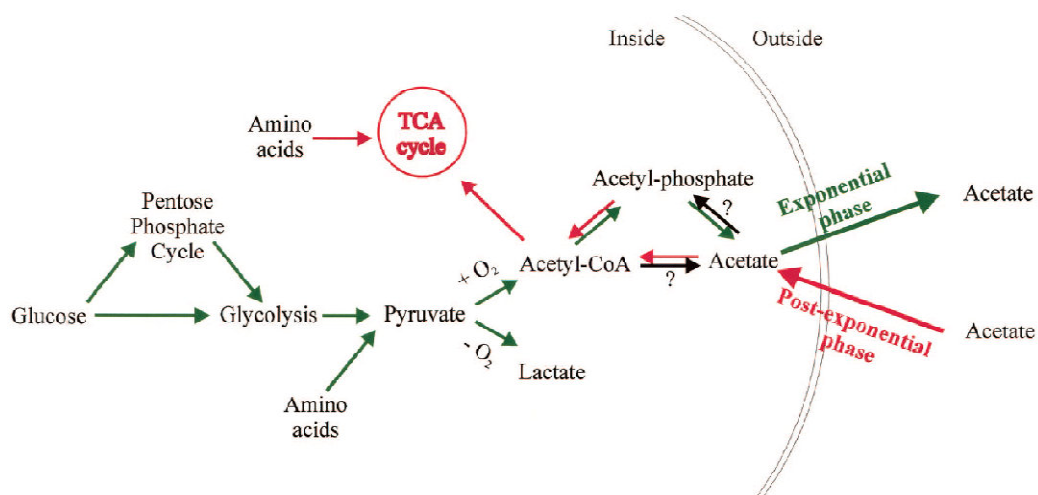


Abb. 1.3: Glukose Katabolismus von *S. aureus*. Grüne Pfeile: überwiegend aktiv während des exponentiellen Wachstums; Rote Pfeile: aktiv während postexponentieller Wachstumsphase (aus Somerville *et al.*, 2003).

### 1.1.4 Zellatmung

Durch die Atmungskette von Prokaryoten und Eukaryoten wird Energie erzeugt, indem durch eine Elektronentransportkette die Energie von Redoxreaktionen in eine Protonen-getriebene Kraft (Proton Motive Force, PMF) umgesetzt wird. Die PMF setzt sich dabei aus einem elektrochemischen Gradienten und dem Konzentrationsgefälle der Protonen über die Membran zusammen (Jormakka *et al.*, 2003).

Diese respiratorischen Enzyme (Komplex I bis IV) in der Membran bilden die Elektronentransportkette. Die hier transferierten Elektronen stammen von den Reduktionsmitteln NADH und Succinat, die in der Glykolyse und im TCA Zyklus gebildet werden. Die Oxidation von NADH durch Komplex I und Succinat durch Komplex II stellt Elektronen bereit, die nach Transfer von Komplex III zum terminalen Komplex IV zur Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser genutzt werden. Die durch die Oxidation der Substrate freigesetzte Energie wird genutzt, um Protonen gegen das Membranpotential nach außen zu pumpen (Jormakka *et al.*, 2003). Der anschließende Protonenrückfluss durch die Membran ins Zellinnere verläuft über die ATP-Synthase und stellt die erforderliche Energie zur Gewinnung von ATP aus ADP und Phosphat bereit (Mitchell, 1961; Jormakka *et al.*, 2003).

Die Quinone fungieren als mobile und lipophile Träger von Elektronen und Protonen und übermitteln den Elektronentransfer zwischen den membrangebundenen Protein-Komplexen (Lancaster *et al.*, 2007). In der Natur existiert eine Vielzahl an verschiedenen Quinon-Derivaten. Während in der mitochondrialen Atmungskette Ubiquinon eingesetzt wird, besitzt *S. aureus* ausschließlich Menaquinon als respiratorisches Quinon (Collins und Jones, 1981; Bentley und Meganathan, 1982).

Für die aerobe Atmung besitzen Bakterien ein verzweigtes System, das entsprechend auf die physiologischen Anforderungen und Umweltbedingungen reagieren kann. So können Bakterien verschiedene terminale Oxidasen besitzen, die die Oxidation eines Substrats mit der Reduktion von Sauerstoff verknüpfen (Borisov *et al.*, 2011). *S. aureus* besitzt wie *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) die zwei terminalen Quinol-Oxidasen Cytochrom bd und Cytochrom aa<sub>3</sub> (Tynecka *et al.*, 1999; Zamboni und Sauer, 2003; Hammer *et al.*, 2013). Wenn ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe vorhanden sind, scheint in *B. subtilis* vorwiegend die Cytochrom aa<sub>3</sub> Oxidase aktiv zu sein, wohingegen die hoch Sauerstoff-affine Cytochrom bd Oxidase eher bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen eingesetzt wird (Zamboni und Sauer, 2003).

Vermutlich verhält es sich bei *S. aureus* ähnlich, da diesem im Wirt je nach Umgebung unterschiedliche Mengen an Sauerstoff zur Verfügung stehen und eine verzweigte

Atmungskette eine schnelle Anpassung an die Bedingungen ermöglicht (Hammer *et al.*, 2013). *S. aureus* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium und besitzt neben der aeroben Atmung noch zwei weitere Möglichkeiten, um Energie zu generieren (Jeacocke *et al.*, 1972). Ist kein Sauerstoff vorhanden, nutzt *S. aureus* Nitrat als alternativen terminalen Elektronenakzeptor zur anaeroben Atmung (Fuchs *et al.*, 2007). Sind weder Sauerstoff noch Nitrat zugänglich, gewinnt *S. aureus* Energie durch Fermentation, wobei Lactat oder Acetat entstehen (Fuchs *et al.*, 2007; Hammer *et al.*, 2013).

### 1.1.5 Klinische Relevanz

*S. aureus* ist ein kommensales Bakterium und kolonisiert die Haut des Wirts, in der Regel ohne für diesen schädlich zu sein. Während etwa 20 % der Bevölkerung permanente Träger von *S. aureus* sind, werden ungefähr 60 % der Menschen nur zeitweise kolonisiert und lediglich 20 % der Bevölkerung weisen zu keinem Zeitpunkt einen *S. aureus* Stamm auf (Kluytmans *et al.*, 1997).

Darüberhinaus ist *S. aureus* ein opportunistisches humanes Pathogen, welches einer der häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen ist. Insbesondere verschiedene antibiotika-resistente Stämme sind im Krankenhaus ein ernsthaftes Problem (Bereket *et al.*, 2012). Die Übertragung findet meistens über Schmierinfektionen statt, wobei das Krankenhauspersonal entweder als Träger oder als Übermittler eine wichtige Rolle spielt. Auch kontaminierte Gegenstände kommen als Infektionsherd in Frage, da *S. aureus* über längere Zeit ohne Wasser und Nährstoffe überleben kann. Weniger häufig tritt eine Tröpfchenübertragung auf (Lowy, 1998).

Wenn das Bakterium durch eine Wunde die mechanischen Barrieren der Haut überwindet, kann entweder eine lokale, eine invasive oder eine systemische Infektion entstehen. Vorwiegend bei immunsupprimierten Personen kann sich der Erreger schnell im Organismus ausbreiten (Darai *et al.*, 2012).

*S. aureus* verursacht eine Vielzahl unterschiedlicher Infektionen, welche zum Teil die Produktion von Eiter auslösen. Bei den oberflächlichen und lokal begrenzten Entzündungen handelt es sich beispielsweise um Wundinfektionen, Furunkel oder Borkenflechte (Impetigo contagiosa). Bei invasiven Prozessen treten Abszesse, Entzündungen der Brust (Mastitis), der Nasennebenhöhlen (Sinusitis), des Mittelohrs (Otitis media) oder der Hirnhaut (sekundäre Meningitis) auf. Die systemischen Infektionen sind unter anderem Blutvergiftungen (Sepsis), Knochenmarkentzündungen (hämatogene Osteomyelitis) und Herzzinnenhautentzündungen

(Endokarditis). Außerdem kommen infektiöse Prozesse vor, die durch Fremdkörper hervorgerufen werden, wie beispielsweise Katheter oder Implantate. Manche *S. aureus* Stämme geben Exotoxine ab, die unter anderem zum toxischen Schocksyndrom (TSS) führen können, welches ein lebensbedrohliches Kreislauf- und Organversagen hervorruft (Darai *et al.*, 2012). Des Weiteren kann *S. aureus* in Nahrungsmitteln durch Enterotoxine Lebensmittelintoxikationen auslösen und ist nach Salmonellen der am zweithäufigsten vorkommende Erreger in verunreinigten Lebensmitteln (Le Loir *et al.*, 2003).

### 1.1.6 Virulenzfaktoren

*S. aureus* zeichnet sich durch seine Adaptionfähigkeit an die Umwelt aus und löst durch toxin-vermittelte Virulenz, Antibiotikaresistenzen und Invasivität eine Vielzahl von Krankheiten aus (Ortega *et al.*, 2010). Die Virulenzfaktoren dienen *S. aureus* dazu, sich an Wirtsstrukturen anzulagern, Gewebe zu zerstören sowie in verschiedene Wirtszellen einzudringen, sich zu vermehren oder intrazellulär zu persistieren (Lowy, 1998).

*S. aureus* besitzt eine große Anzahl an unterschiedlichen Virulenzfaktoren (Abb. 1.4), wie die zytolytischen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Toxine, welche enzymatisch eine Hämolyse oder Leukolyse hervorrufen. Des Weiteren verfügt *S. aureus* über die Enterotoxine A bis E, die bei Lebensmittelvergiftungen auftreten und Erbrechen, Durchfall und Schock hervorrufen. Darüberhinaus können Superantigentoxine, wie das toxische Shock Syndrom-Toxin, einen systemischen Schock verursachen (Madigan *et al.*, 2003; Darai *et al.*, 2012).

Superantigentoxine sind Exotoxine, die eine verstärkte Immunantwort auslösen, da anstatt 0,01 % bis zu 25 % der T-Zellen aktiviert werden. Dies geschieht, indem die Superantigene nicht nur an die variable Antigen-Bindungsdomäne, sondern gleichzeitig auch an konservierte Bereiche der T-Zell-Rezeptoren binden. Die aktivierten T-Zellen sekretieren Zytokine, wodurch andere Immunzellen aktiviert werden und eine systemische Entzündungsreaktion induzieren (Madigan *et al.*, 2003).

Ein weiterer Faktor mit hohem Virulenzpotential, der besonders häufig bei ambulant erworbenen MRSA Infektionen auftritt, ist das Exotoxin Panton-Valentine Leukozidin (PVL). Durch die PVL-vermittelte Porenbildung in der Zellmembran von Leukozyten sterben diese Zellen durch Zytolyse ab und fungieren als Nährstoffquellen für das bakterielle Wachstum (Lo und Wang, 2011).

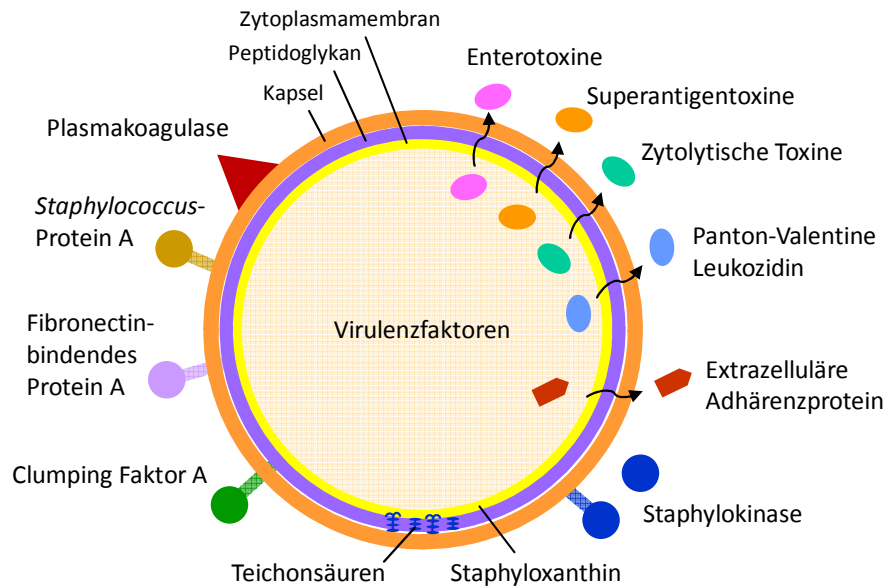


Abb.1.4: Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Dargestellt ist eine Auswahl an Faktoren, wie Oberflächenproteine, sekretierte Proteine und die Teichonsäuren der Zellwand, welche die Virulenz von *S. aureus* vermitteln (modifiziert nach Lowy, 1998).

Die Lipoteichonsäure und die Wandteichonsäure sind Bestandteile der Zellwand von gram-positiven Bakterien und in der Peptidoglykanschicht bzw. in der Zytoplasmamembran verankert. Die Teichonsäuren gehören zu den exogenen Pyrogenen, die beim Patienten eine fieberhafte Reaktion auslösen. Sie dienen *S. aureus* unter anderem als Schutz vor antimikrobiellen Peptiden und Fettsäuren, vermitteln Zelladhärenz, aber aktivieren auch das Komplementsystem des Wirts und verursachen eine Entzündung (Xia *et al.*, 2010).

Die gelbe Farbe der *S. aureus* Kolonien wird durch das Karotinoid Staphyloxanthin hervorgerufen, das als Schutzpigment in der Zellmembran fungiert (Ohnoki *et al.*, 1962; Hammond und White, 1970). Staphyloxanthin dient *S. aureus* zur Verstärkung seiner Virulenz, indem es als Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffspezies agiert, die vom Immunsystem des Wirts zur Detoxifizierung eingesetzt werden (Clauditz *et al.*, 2006). Des Weiteren schützt es die Bakterien vor einem Abtöten durch Neutrophile (Liu *et al.*, 2005). Durch ein gezieltes Ausschalten des Staphyloxanthins wären die Pathogene für eine Eliminierung durch das Immunsystem des Patienten zugänglich, woraus sich ein potentielles Target für neue Medikamente ergibt (Liu *et al.*, 2008).

*S. aureus* wird unter anderem durch das Zellwand-Oberflächenprotein *Staphylococcus*-Protein A (SpA) vor einer Erkennung durch das Immunsystem geschützt. Indem an SpA nicht die F<sub>ab</sub>-sondern die F<sub>c</sub>-Regionen von Immunglobulinen binden, können die Bakterien nicht opsonisiert und daher schlechter phagozytiert werden. Darüberhinaus fungiert das sekretierte



SpA als Superantigen, indem es an die Oberfläche von B-Lymphozyten bindet und deren Zelltod verursacht (Kim *et al.*, 2012a).

Des Weiteren besitzt *S. aureus* Virulenzfaktoren wie die Fibronectin-bindenden Proteine Protein A und Clumping factor A, welche an der bakteriellen Oberfläche eine Rolle bei der Anheftung an die Wirtszellen spielen (Menzies, 2003; Foster, 2005; Foster, 2009). Sowohl SpA als auch die Fibronectin-bindenden Proteine werden als MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet (Foster und Höök, 1998). *S. aureus* besitzt noch viele weitere Fibrinogen-assoziierte Proteine, wie beispielsweise die Plasmakoagulase, die durch Aktivierung von Prothrombin Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Die dadurch hervorgerufene Blutgerinnung ermöglicht *S. aureus* die Vermehrung im Wirt in einer Fibrinkapsel (McAdow *et al.*, 2012).

Nach der Vermehrung aktiviert die Staphylokinase von *S. aureus* das Plasminogen des Wirts, woraufhin die entstandene Peptidase Plasmin die Fibrinkapsel lysiert und *S. aureus* die Ausbreitung im Wirt ermöglicht (Bergmann und Hammerschmidt, 2007). Um aus dem Blutssystem ins umliegende Gewebe zu gelangen, besitzt *S. aureus* mehrere Faktoren, die eine Anheftung an Endothelzellen ermöglichen. Neben den bereits erwähnten Teichonsäuren und Fibronectin-bindenden Proteinen wird das extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) sekretiert, welches eine Bindung zwischen *S. aureus* und dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) der Endothelzellen vermittelt (Sinha und Herrmann, 2005). Nach Aufnahme in die Endothelzellen gelangt *S. aureus* mit Hilfe von proteolytischen Enzymen in tiefergelegenes Gewebe und verursacht dort Entzündungen (Lowy, 1998).

Neben den beschriebenen Virulenzfaktoren kann bei einer *S. aureus* Infektion spontan ein veränderter und reversibler Phänotyp auftreten, der als small-colony variant (SCV) bezeichnet wird. Die SCVs haben eine größere Tendenz im Wirt zu persistieren und sind aufgrund einer verbesserten Adaptation an die intrazellulären Bedingungen und eines anderen Resistenzprofils gegenüber Antibiotika weitaus schwieriger zu behandeln (Tuchscherr *et al.*, 2010).

### **1.1.7 Andere *Staphylococcus* Spezies**

Neben *S. aureus*, dem häufigsten Erreger von Staphylokokken-Infektionen, gibt es noch weitere humanpathogene Staphylokokken, die zwar eine geringere Anzahl an Virulenzfaktoren aufweisen, aber dennoch schwerwiegende Infektionen verursachen können (Rosenstein und Götz, 2013).

So gelangt *Staphylococcus epidermidis* oftmals durch den Einsatz von Implantaten oder Kathetern in den Körper und löst Infektionen aus, welche aufgrund von Biofilmbildung schwer zu bekämpfen sind (Winslow und Winslow, 1908; Schleifer und Kloos, 1975; Vuong und Otto, 2002).

Des Weiteren handelt es sich bei *Staphylococcus lugdunensis* um einen Erreger, der vorwiegend Infektionen in den Weichteilen, im zentralen Nervensystem, in den Harnwegen und im Blutkreislauf hervorruft, wobei speziell eine Endokarditis häufiger auftreten kann (Freney *et al.*, 1988; Klotchko *et al.*, 2011).

*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ist der zweithäufigste Erreger von Harnwegsinfektionen und kann durch die Verwendung von Kathetern auch zur Bakteriämie führen (Shaw *et al.*, 1951; Choi *et al.*, 2006).

Aufgrund seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung sowie immer häufiger auftretender Multi-Resistenzen ist *Staphylococcus haemolyticus* ebenfalls ein schwer zu behandelnder Krankheitserreger (Shittu *et al.*, 2005). Außer Menschen besiedelt *S. haemolyticus* auch domestizierte Tiere und verursacht unter anderem Harnwegsinfektionen, Sepsis und Ohrentzündungen (Schleifer und Kloos, 1975).

Darüberhinaus gibt es auch Staphylokokken, welche als primäre Tier-assoziierte Erreger für den Menschen in der Regel ungefährlich sind. Beispiele dafür sind *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* oder auch *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, welche bei verschiedenen Tieren wie Katzen, Pferden, Rindern und Hunden auftreten (Igimi *et al.*, 1989; Devriese *et al.*, 1978; Schleifer *et al.*, 1984; Igimi *et al.*, 1990).

Die Entdeckung, dass *Staphylococcus carnosus* eine Rolle bei der Reifung von Rohwurst spielt, führte zu dem bewussten Einsatz dieser Staphylokokken als Starterkulturen in der Fleischproduktion (Niinivara und Pohja, 1956; Rheinbaben und Hadlok, 1979; Schleifer und Fischer, 1982). Hierbei reduziert *S. carnosus* Nitrat zu Nitrit, welches dann weiter zu Ammonium reduziert wird und somit den Gehalt an Nitrit in der Wurst verringert. Auch das von Lactobazillen produzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird durch die Katalase von *S. carnosus* reduziert (Rosenstein *et al.*, 2009).

## 1.2 Antibiotika

### 1.2.1 Die Entwicklung von Antibiotika im historischen Kontext

Bis 1941 konnten Infektionen mit Staphylokokken nur durch chirurgische Eingriffe behandelt werden. Dies änderte sich mit der Entdeckung des Penicillins (Abb. 1.5), welches im zweiten Weltkrieg eine nicht-invasive und zunächst überaus effektive Behandlung erlaubte (Fleming, 1929; Chain *et al.*, 1940; Chain *et al.*, 1945; Florey, 1945). Für dessen Entdeckung und die Heilung vieler Infektionskrankheiten erhielten Alexander Fleming, Ernst B. Chain und Howard W. Florey 1945 den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin.

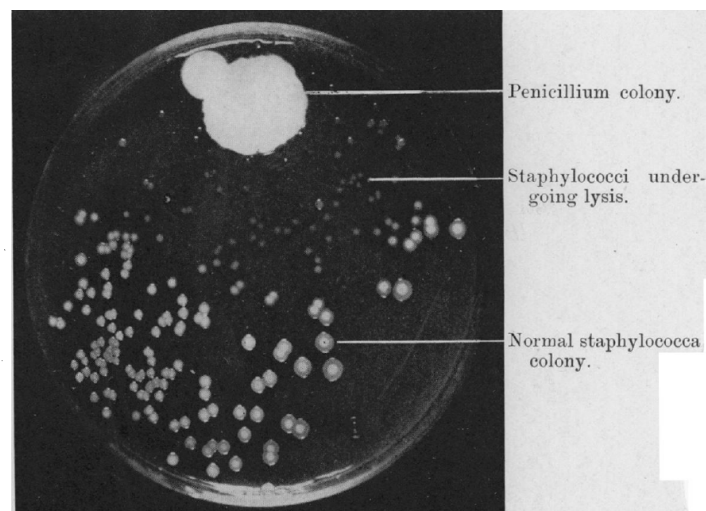


Abb. 1.5: Auflösung von Staphylokokken-Kolonien in der Nachbarschaft einer Penicillium-Kolonie (aus Fleming, 1929).

Bereits 1942, nur kurze Zeit nach Beginn der Antibiotikatherapie, wurden penicillin-resistente *S. aureus* Stämme von Patienten isoliert. Einige Patienten waren jedoch nicht mit Penicillin behandelt worden, weshalb die Resistenz dieser Stämme „natürlichen“ Ursprungs sein musste und nicht durch eine Penicillin-Behandlung aufgrund von Selektionsdruck erworben wurde (Kirby, 1944). Das Auftreten von resistenten Stämmen nahm über die Zeit zu. Im Jahr 1948 zeigte eine Untersuchung von Staphylokokken-Infektionen in einem Krankenhaus, dass 59 % der Isolate penicillin-resistent waren (Barber und Rozwadowska-Dowzenko, 1948).

In den 1950er und 1960er Jahren kam es in vielen Ländern zu schweren Ausbrüchen von Staphylokokken-Infektionen. Die Ursache war das Auftreten von penicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen der Phagentypen 80/81 in Krankenhäusern, wobei nicht nur Patienten sondern auch das Krankenhauspersonal stark betroffen waren (Rountree und Freeman, 1955; Bynoe *et al.*, 1956; Williams *et al.*, 1959).

Die Entwicklung der halbsynthetischen Penicillin-Derivate Methicillin (Rolinson *et al.*, 1960) und Oxacillin (Knudsen *et al.*, 1962) sollte die Behandlung von Staphylokokken-Infektionen erleichtern, jedoch zeigten sich bereits innerhalb weniger Monate neue resistente Stämme (Jevons, 1961). Darüberhinaus ergab sich nun das Problem, dass sich manche Staphylokokken zu gefährlichen multi-resistenten Erregern entwickelt hatten und die häufigste Ursache von nosokomialen Infektionen weltweit waren (Richmond *et al.*, 1964).

Das 1953 entdeckte Vancomycin wurde aus *Streptomyces orientalis* isoliert (Griffith und Peck, 1956) und nach dem englischen Begriff „to vanquish“ (deutsch: besiegen) bezeichnet (Jovetic *et al.*, 2010). Es wurde in den ersten 20 Jahren aufgrund von starken Nebenwirkungen nur als Reserveantibiotikum für die Behandlung von schweren Staphylokokken-Infektionen eingesetzt. Durch einen verbesserten Reinheitsgrad konnten später viele der Nebenwirkungen verringert werden (Jovetic *et al.*, 2010). Jedoch wurde Vancomycin in den 1970er und 1980er Jahren immer häufiger bei den zunehmend methicillin-resistenten Stämmen verwendet, da die  $\beta$ -Laktam Antibiotika ihre Wirkung verloren hatten (Griffith, 1984). 1996 wurde der erste *S. aureus* Stamm mit einer intermediären Vancomycin-Resistenz (MMWR, 1997) und 2002 der erste *S. aureus* Stamm mit einer ausgeprägten Vancomycin-Resistenz nachgewiesen (Chang *et al.*, 2003).

Gegenwärtig werden vorwiegend Linezolid, Vancomycin, Clindamycin, Tigecyclin, Daptomycin sowie Quinupristin-Dalfopristin gegen die methicillin-resistenten *S. aureus* Stämme eingesetzt (Liu *et al.*, 2011a). 2012 wurde in Deutschland das  $\beta$ -Laktam Antibiotikum Ceftarolinosamil zur Behandlung von Lungenentzündungen und Gewebeerkrankungen zugelassen (File *et al.*, 2012). Jedoch werden dringend Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen benötigt, denn das Problem der Entwicklung neuer resistenter Stämme bleibt weiterhin bestehen.

### **1.2.2 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen**

Im Jahr 1877 beschrieb Louis Pasteur, dass ein Mikroorganismus durch die Sekretion eines Stoffes eine Wachstumshemmung einer anderen Spezies verursacht und dadurch einen Vorteil erlangt (Persidis, 1999). Dieser Vorgang wurde von dem Mediziner Paul Vuillemin als Antibiose beschrieben (Vuillemin, 1889), weshalb diese inhibierenden Stoffe später als Antibiotika bezeichnet wurden.

Antibiotika werden zunächst entsprechend ihrer Wirkung in bakterizide oder bakteriostatische Wirkstoffe eingeteilt. Hierbei zeichnen sich Bakterizide durch ein Abtöten der Bakterien aus,

wohingegen Bakteriostatika das bakterielle Wachstum hemmen. Jedoch ist eine klare Abgrenzung in manchen Fällen nicht möglich, da auch bakteriostatische Antibiotika Bakterien abtöten und bakterizide Wirkstoffe nicht immer jedes Bakterium eliminieren. Daher ist die Wirkung einiger Antibiotika sowohl bakterizid als auch bakteriostatisch (Pankey und Sabath, 2004).

Durch einen anfänglich unbedachten Einsatz von Antibiotika entstanden sehr früh Resistenzen, die beweisen, wie flexibel und schnell sich Mikroorganismen an ihre Umwelt anpassen (Sykes, 2010). Dieser Vorgang ist nicht nur die Reaktion einer einzelnen Spezies, sondern vielmehr die evolutionär entstandene Überlebensstrategie komplexer Systeme. Die meisten Antibiotika sind, zumindest in ihrer Grundstruktur, biologischen Ursprungs und waren lange Zeit vor Beginn ihres therapeutischen Einsatzes in der Umwelt vorhanden, weshalb Mikroorganismen bereits Resistenzmechanismen entwickelt hatten (Sykes, 2010).

Prinzipiell besitzen Mikroorganismen drei verschiedene Formen von Resistenzmechanismen. Zum einen können spezifische Enzyme das Antibiotikum durch Degradierung inaktivieren. Ein Beispiel hierfür ist die  $\beta$ -Laktamase, die in resistenten *S. aureus* Stämmen Penicillin unwirksam macht (Kap. 1.2.3.1). Des Weiteren kann durch eine Modifizierung der Zielstruktur die Interaktion mit dem Antibiotikum inhibiert werden. Diese Art der Resistenz tritt beispielsweise bei methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämmen auf (Kap. 1.2.3.1). Zuletzt kann der Zugang zum Target unterbunden werden, wobei entweder eine veränderte Zellwandstruktur die Aufnahme des Antibiotikums in die Zelle verhindert oder ein Effluxpumpen-basierter Transport den Wirkstoff aus der Zelle ausschleust (Livermore, 2003). Bekanntermaßen handelt es sich bei der Resistenz von *Escherichia coli* (*E. coli*) gegen Tetrazyklin um eine aktive Ausschleusung des Wirkstoffes (Kap. 1.2.3.3).

Es werden jedoch nicht nur manifestierte, sondern auch reversible Resistenzen beobachtet. So gibt es eine Verbindung zwischen der Dauer einer Antibiotikatherapie und dem Auftreten von resistenten Erregern. Zunächst wurde nach Behandlungsende ein Rückgang an resistenten Bakterien in einer Population festgestellt. Jedoch tritt die Resistenz in dieser Population bei einer erneuten Antibiotikagabe nach kurzer Zeit wieder auf, da der Resistenzmechanismus selbst weiterhin bestehen bleibt. Somit fördert die Verwendung von Antibiotika das Auftreten resistenter Stämme, wobei der Resistenzmechanismus nicht immer neu erworben sein muss, sondern bereits im Erreger vorhanden sein kann (Darai *et al.*, 2012).

### 1.2.3 Antibiotikaklassen

Antibiotika werden nach dem Wirkmechanismus und Target einer Substanz klassifiziert. Die Mehrheit der Antibiotika inhibiert die Synthese von Peptidoglykan, Proteinen, DNA oder RNA (Kahne *et al.*, 2005). Eine Übersicht zur Interaktion der verschiedenen Antibiotikaklassen mit der jeweiligen bakteriellen Zielstruktur ist in Abb. 1.6 dargestellt. In den folgenden Kapiteln werden die Wirkungsmechanismen einiger Antibiotika sowie die Resistenzmechanismen der Bakterien kurz erläutert.

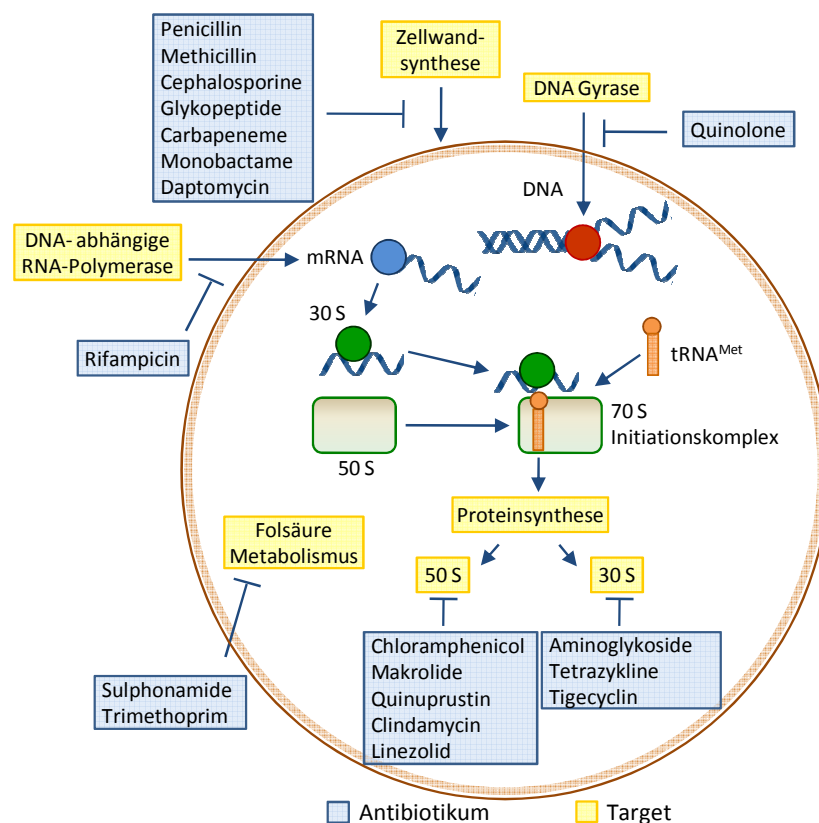


Abb. 1.6: Interaktion der verschiedenen Antibiotikaklassen mit der jeweiligen Zielstruktur einer Bakterienzelle (modifiziert nach Lewis, 2013).

#### 1.2.3.1 $\beta$ -Laktam Antibiotika: Penicillin und Methicillin

Das bekannteste Antibiotikum ist das aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* isolierte Penicillin, welches der Gruppe der bakterizid wirkenden  $\beta$ -Laktam Antibiotika angehört (Fleming, 1929). Das Grundgerüst aller  $\beta$ -Laktam Antibiotika ist der namensgebende viergliedrige  $\beta$ -Laktam Ring, der sich aus drei Kohlenstoffatomen sowie einem Stickstoffatom zusammensetzt. Das an den Stickstoff angrenzende Kohlenstoffatom besitzt

dazu eine Carbonylgruppe (Hou und Poole, 1971). Neben den Penicillinen haben auch Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame den  $\beta$ -Laktam Ring (Abb. 1.7). Die bakteriolytische Wirkung der  $\beta$ -Laktam Antibiotika beruht auf der Inhibierung der Peptidoglykansynthese. Da die Zellwand von gram-positiven Bakterien im Vergleich zu gram-negativen Bakterien eine viel ausgeprägtere Peptidoglykanschicht aufweist, ist die Wirkung der  $\beta$ -Laktame auf gram-positive Bakterien erheblich stärker (Fleming, 1929).

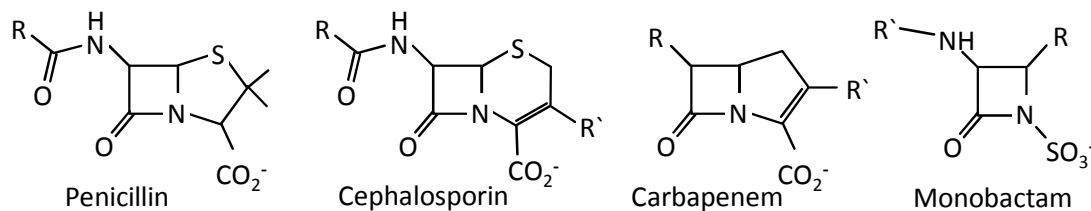


Abb.1.7: Chemische Strukturen der  $\beta$ -Laktam Antibiotikagruppen Penicillin, Cephalosporin, Carbapenem und Monobactam (übernommen aus Zervosen *et al.*, 2012).

In der späten extrazellulären Phase der Peptidoglykansynthese findet die Verknüpfung des L-Lysin-Restes der N-Acetylmuraminsäure mit einem Pentaglycin-Molekül statt (Tipper und Strominger, 1965). Diese Transpeptidase Reaktion wird durch die Fem-Proteine umgesetzt und von den Penicillin-bindenden Proteine (PBP) katalysiert. Das  $\beta$ -Laktam Antibiotikum Penicillin fungiert als sterisches Analog des D-Ala-D-Ala-Restes des Stammpeptides und bindet mit hoher Affinität an die Domäne der PBP, die für die Transpeptidase Reaktion verantwortlich ist (Sykes, 2010). Die Konsequenz davon ist, dass die Enzyme der Zellwandsynthese blockiert sind und die Verknüpfung zwischen den beiden Glykanketten nicht mehr erfolgen kann, weshalb Läsionen in der Zellwand entstehen. In Folge kann der osmotische Druck nicht mehr kompensiert werden, das Zytoplasma wird freigesetzt und der Zelltod tritt ein (Stapleton und Taylor, 2002).

Die vermutlich über horizontalen Gentransfer erworbene Resistenz gegenüber Penicillin erfolgt durch eine enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums (Abraham und Chain, 1940; Bondi und Dietz, 1945). Dieses Enzym, zunächst als Penicillinase bezeichnet, ist heutzutage unter dem Namen  $\beta$ -Laktamase bekannt. Die Inaktivierung wird durch eine Hydrolyse der Amidbindung des  $\beta$ -Laktam Ringes hervorgerufen (Bush und Sykes, 1983).

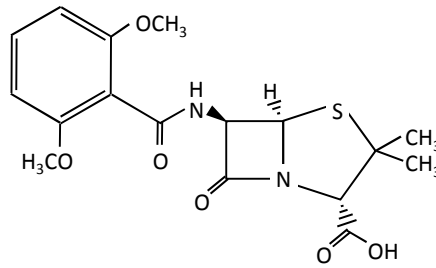


Abb. 1.8: Chemische Struktur des Penicillin-Derivates Methicillin (aus Rolinson *et al.*, 1960).

Das auf der Struktur von Penicillin basierende und semisynthetisch hergestellte Methicillin wird nicht durch die  $\beta$ -Laktamase inaktiviert (Abb. 1.8). Vielmehr entsteht die Resistenz gegen Methicillin durch die Modifizierung des Targets, weshalb die Bindung zwischen Methicillin und dem modifizierten PBP nicht erfolgt. Die Methicillin-Resistenz erwarb *S. aureus* vermutlich von anderen Staphylokokken durch die Aufnahme eines mobilen genetischen Elements in Form einer SCC (*Staphylococcus* Chromosomale Cassette) inklusive des *mecA* Gens (Dornbusch *et al.*, 1969; Ubukata *et al.*, 1989). Das *mecA* Gen kodiert für das modifizierte PBP2a, welches eine geringe Affinität gegenüber  $\beta$ -Laktamen aufweist. Dieses Protein dient methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen als Ersatzenzym anstelle der PBPs zur Synthese von Peptidoglykan (Utsui und Yokota, 1985).

### 1.2.3.2 Glykopeptid-Antibiotika: Vancomycin und Teicoplanin

Eine weitere wichtige Gruppe von Antibiotika zur Behandlung von *S. aureus* Infektionen sind die Glykopeptide, zu welchen Vancomycin und Teicoplanin gehören (Abb. 1.9). Aufgrund relativ selten auftretender Resistenzen gegenüber Vancomycin und Teicoplanin fungieren diese als Reserveantibiotika und werden gezielt bei schweren MRSA Infektionen verwendet.

Diese Antibiotika wirken bakteriolysisch, indem die Peptidoglykansynthese von ausschließlich gram-positiven Bakterien gehemmt wird. Die Inhibierung erfolgt extrazellulär, wobei der Wirkstoff an den C-terminalen D-Ala-D-Ala-Rest des N-acetyl-muramyl-Pentapeptid-Vorläufermoleküls bindet. Dies blockiert sowohl die Transglykolisierung als auch die Transpeptidase-Reaktion (Perkins, 1969; Sheldrick *et al.*, 1978).

Bislang wurden zwei verschiedene Arten von glykopeptid-resistenten *S. aureus* Stämmen beobachtet. Zum einen sind intermediär vancomycin-resistente Stämme entstanden, die eine dickere, aber schlechter vernetzte Zellwand besitzen, da die Glykopeptid-Antibiotika an den D-Ala-D-Ala-Rest im Randbereich der Zellwand binden (Cui *et al.*, 2003). Zum anderen gibt es hochgradig vancomycin-resistente Stämme, welche anstelle von D-Ala-D-Ala das



Depsipeptid D-Ala-D-Lac im Peptidoglykanvorläufer aufweisen, wodurch die Bindungsaffinität der Glykopeptide stark reduziert wird (Allen *et al.*, 1992; Weigel *et al.*, 2003). Diese Resistenz wird durch mehrere Gene des Transposons Tn1546 vermittelt, das wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer von *Enterococcus faecalis* erworben wurde (Weigel *et al.*, 2003).

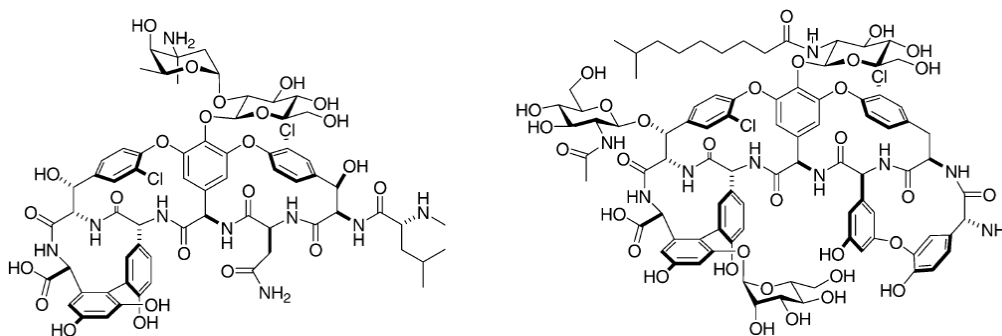


Abb. 1.9: Chemische Strukturen der Glykopeptid-Antibiotika Vancomycin (links) und Teicoplanin (rechts) (aus Kahne *et al.*, 2005).

### 1.2.3.3 Polyketid-Antibiotika: Tetracyklin

Zur Antibiotikaklasse der Polyketide gehören unter anderem die Tetracykline, die bakteriostatisch auf die ribosomale Proteinbiosynthese von gram-positiven und gram-negativen Bakterien wirken. Beispiele für Wirkstoffe in der Tetracyklingruppe sind Chlortetracyklin, Tetracyklin, Doxzyklin und Oxytetracyklin (Abb. 1.10).

Tetracyklin bindet in einem Komplex mit  $Mg^{2+}$  an die 30S-ribosomale Untereinheit und verhindert vermutlich die Bindung zwischen Aminoacyl-tRNA und Ribosom, indem die Akzeptorstelle am Ribosom blockiert wird (Suarez und Nathans, 1965; Semenov *et al.*, 1982; Goldman *et al.*, 1983; Chopra *et al.*, 1992).

Der bekannteste Tetracyklin-Resistenzmechanismus ist die aktive Ausschleusung von Tetracyklin mithilfe von membranständigen Effluxproteinen in gram-negativen Bakterien,

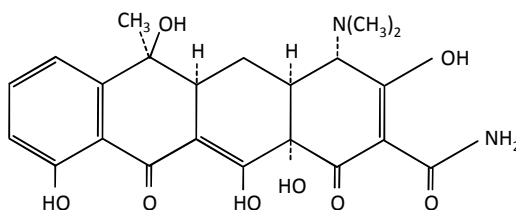


Abb. 1.10: Chemische Struktur des Polyketid-Antibiotikums Tetracyklin (aus Griffin *et al.*, 2010).

welche durch Proteine der Tet-Familie reguliert werden (Levy und McMurry, 1974; McMurry *et al.*, 1980; Hinrichs *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1990a). Die *tet*-Gene stammen ursprünglich von den Antibiotika produzierenden Streptomyceten und wurden mithilfe von Plasmiden über lateralen Gentransfer weitergegeben (Benveniste und Davies, 1973).

Das Tetrazyklin-induzierbare Tet-Repressor-Operator-System in *E. coli* setzt sich aus zwei gegenläufig orientierten Genen zusammen, bei dem ein Gen für das Effluxprotein TetA und das andere Gen für das Helix-Turn-Helix Repressorprotein TetR kodiert (Hillen und Berens, 1994; Orth *et al.*, 2000). Die Genexpression von *tetA* und *tetR* wird über die gemeinsame Operator-Region *tetO* gesteuert. Im Grundzustand blockiert TetR durch Bindung an *tetO* die Expression beider Gene. Sind Tetrazyklin-Mg<sup>2+</sup> Komplexe in der Zelle vorhanden, findet durch deren Bindung an TetR eine Konformationsänderung statt und TetR löst sich vom Operator (Hillen *et al.*, 1982). Das nun exprimierte Effluxprotein TetA wird in der Membran verankert und Tetrazyklin-Mg<sup>2+</sup> wird entgegen des Konzentrationsgradienten ausgeschleust (Yamaguchi *et al.*, 1990(b); Hillen und Berens, 1994). Dieser Mechanismus wird heutzutage in Form des Tet-On-Tet-Off Systems als genetisches Werkzeug eingesetzt, mit dem gezielt die Expression beliebiger Gene gesteuert werden kann (Gossen und Bujard, 1992).

Es gibt verschiedene Tetrazyklin-Determinanten, die bei gram-positiven und gram-negativen Bakterien mit variierender Häufigkeit auftreten (Chopra und Roberts, 2001). Tetrazyklin-resistente *S. aureus* Stämme besitzen in der Regel mindestens eine der drei Tetrazyklin-Determinanten Tet(K), Tet(L) oder Tet(M). Während *tet(K)* und *tet(L)* für Effluxproteine kodieren, vermittelt *tet(M)* einen ribosomalen Schutz vor Tetrazyklin (Khan und Novick, 1983; Bismuth *et al.*, 1990; Chopra *et al.*, 1992).

Die Expression des Effluxproteins Tet(L) zur Ausschleusung von Tetrazyklin beruht auf dem Mechanismus einer translationalen Attenuierung. Oberhalb des *tet(L)*-Gens wurde eine Signalsequenz mit einer mRNA-Haarnadelstruktur gefunden, in deren Nähe zwei Ribosom-Bindungsstellen (RBS1 und RBS2) vorkommen (Abb. 1.11). Dabei befindet sich die RBS1 oberhalb der Signalsequenz, während die RBS2 unterhalb der Signalsequenz, unmittelbar vor dem Start-Kodon des *tet(L)*-Gens, lokalisiert ist. Bei Abwesenheit von Tetrazyklin wird angenommen, dass die mRNA zwei Haarnadelstrukturen besitzt. Dadurch ist die Transkription der Signalsequenz, aber nicht des *tet(L)*-Gens möglich, da die RBS2 nicht für das Ribosom zugänglich ist. Bei Anwesenheit von Tetrazyklin weist die mRNA-Sekundärstruktur vermutlich nur eine Schleife auf. In dieser Konformation kann das Ribosom an die RBS2 binden und durch Transkription der *tet(L)*-mRNA wird das Effluxprotein Tet(L) exprimiert (Hoshino *et al.*, 1985; Schwarz *et al.*, 1992). Die Determinante Tet(M) vermittelt



### 1.2.4 Neue Antibiotika

Die Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen stellt ein ernsthaftes Problem bei der Behandlung von nosokomialen und ambulant erworbenen Infektionen dar (Sass *et al.*, 2011). Insbesondere die Erkrankungen an MRSA sind in den vergangenen Jahrzehnten stark angestiegen, wobei diese Stämme zum Teil auch gegen die Reserveantibiotika Daptomycin, Vancomycin und Linezolid Resistenzen erworben haben (Klevens *et al.*, 2006; Hiramatsu *et al.*, 1997; Tenover *et al.*, 2009; Tsiodras *et al.*, 2001).

Die Entwicklung neuer Antibiotika ist sehr zeit- und kostenintensiv, daher werden zur Reduzierung der Kosten häufig bereits bekannte Antibiotika weiterentwickelt. Zu diesem Zweck werden durch chemische Modifizierung semisynthetische Derivate hergestellt, die beispielsweise geringere Nebenwirkungen auf den Patienten haben oder den Erreger effektiver eliminieren.

Da die bakterielle Zellwand nach wie vor eine erfolgsversprechende Zielstruktur ist, werden bekannte Antibiotika mit diesem Target weiter optimiert. Beispiele dafür sind Spirohexalin, Tripropeptin C, Cyslabdan sowie Targocil, deren Zielstrukturen das Peptidoglykan, das Karotinoid Staphyloxanthin oder die Wandteichonsäure in der Zellwand sind (Koyama *et al.*, 2012).

Weiterhin wurden bekannte Leitstrukturen gezielt auf eine Inhibierung der PBPs getestet, da diese den letzten Schritt der Peptidoglykansynthese katalysieren. Um den Abbau durch  $\beta$ -Laktamasen zu vermeiden, wurden Verbindungen ohne  $\beta$ -Laktam Ring bevorzugt. Zusätzlich wurden bereits bekannte PBP-inhibierende Wirkstoffe weiter optimiert. Dies trifft z. B. auf die Boronsäuren, Phosphonate, Pyrazolidinone, Naphtalensulfonamide und 4-Quinolone zu (Zervosen *et al.*, 2012).

Eine Klasse von Wirkstoffen mit einem neuen Wirkmechanismus gegen gram-positive Pathogene sind die Acyldepsipeptide (ADEP). Die ADEPs verhindern die Zellteilung durch Inhibierung der Septenbildung. Das prokaryotische Zellteilungsprotein FtsZ (Filamenting temperature sensitive mutant Z) ist das Homolog zum eukaryotischen Tubulin und wird von den ADEPs proteolytisch degradiert, welches sich in einem filamentösen Wachstum äußert (Sass *et al.*, 2011).

Zurzeit befinden sich in Deutschland mehrere Antibiotika in klinischen Studien, wie unter anderem das Cephalosporin Ceftobiprol-Medocaril, welches gegen  $\beta$ -Laktamasen stabil ist, das Oxazolidinon Torezolid und das Neoglykosid Plazomicin. Vielversprechend ist außerdem das Fluorquinolon Delafloxacin, das Phase 2 erfolgreich abgeschlossen hat (Holzgrabe, 2013). Allerdings handelt es sich bei den aktuellen Antibiotika, die sich in klinischen Studien

befinden, ausschließlich um bekannte Substanzklassen. Deshalb werden dringend neue Antibiotika benötigt, die ein größeres Potential zur Bekämpfung der immer häufiger auftretenden resistenten Erreger aufweisen (Gwynn *et al.*, 2010).

### 1.2.5 Myxobakterielle Sekundärmetabolite

Myxobakterien sind gram-negative stäbchenförmige Prokaryoten, die in der Erde leben. Bei Nährstoffmangel sind sie in der Lage, Myxosporen und Fruchtkörper zu bilden. Darüberhinaus besitzen sie die charakteristische Eigenschaft, dass sie sich durch Gleiten oder Kriechen fortbewegen können (Dawid, 2000).

Die Myxobakterien sind für die Entwicklung neuer Medikamente besonders interessant, da sie eine große Anzahl an biologisch aktiven Sekundärmetaboliten mit einzigartigen chemischen Strukturen produzieren (Weissmann und Müller, 2009). Manche Sekundärmetabolite können eine antimikrobielle Wirkung besitzen, da sie von den Bakterien unter anderem zur chemischen Abwehr von konkurrierenden Mikroorganismen genutzt werden. Die myxobakteriellen Naturstoffe besitzen eine große Bedeutung in der Medizin, da diese Moleküle aufgrund ihrer antimykotischen, antibakteriellen oder antitumoralen Wirkung zur Behandlung eines breiten Spektrums von Krankheiten eingesetzt werden können (Dawid, 2000).

Die myxobakterielle Gattung *Stigmatella* umfasst die zwei Spezies *Stigmatella erecta* (*S. erecta*) und *Stigmatella aurantiaca* (*S. aurantiaca*) (Höfle und Irschik, 2008). Über *S. aurantiaca* ist bekannt, dass diese Spezies eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten produziert. Dahingegen wurden bisher erst wenige Sekundärmetabolite von *S. erecta* isoliert. Dabei handelt es sich unter anderem um Aurachin P, Stigmatellin, Myxothiazol, Myxalamid, Myxochromid S und 5-Nitroresorcinol (Höfle und Reichenbach, 1995; Höfle und Irschik, 2008).

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *S. erecta* und *S. aurantiaca* gibt es Verbindungen, die in ähnlicher Form von beiden Spezies produziert werden (Abb. 1.12). Neben Aurachin P von *S. erecta* wurden weitere Aurachine von *S. aurantiaca* gefunden, die eine antibakterielle Wirkung gegen gram-positive Bakterien, wie beispielsweise *S. aureus*, besitzen (Kunze *et al.*, 1987; Höfle und Irschik, 2008). Auch Stigmatellin wird sowohl von *S. erecta* als auch von *S. aurantiaca* produziert (Kunze *et al.*, 1984). Eine antibakterielle Wirkung von Stigmatellin ist nur gegen wenige gram-positive Bakterien vorhanden, wobei *S. aureus* nicht betroffen ist. Dagegen wirkt Stigmatellin inhibitorisch auf Hefen und filamentöse Pilze (Kunze *et al.*,

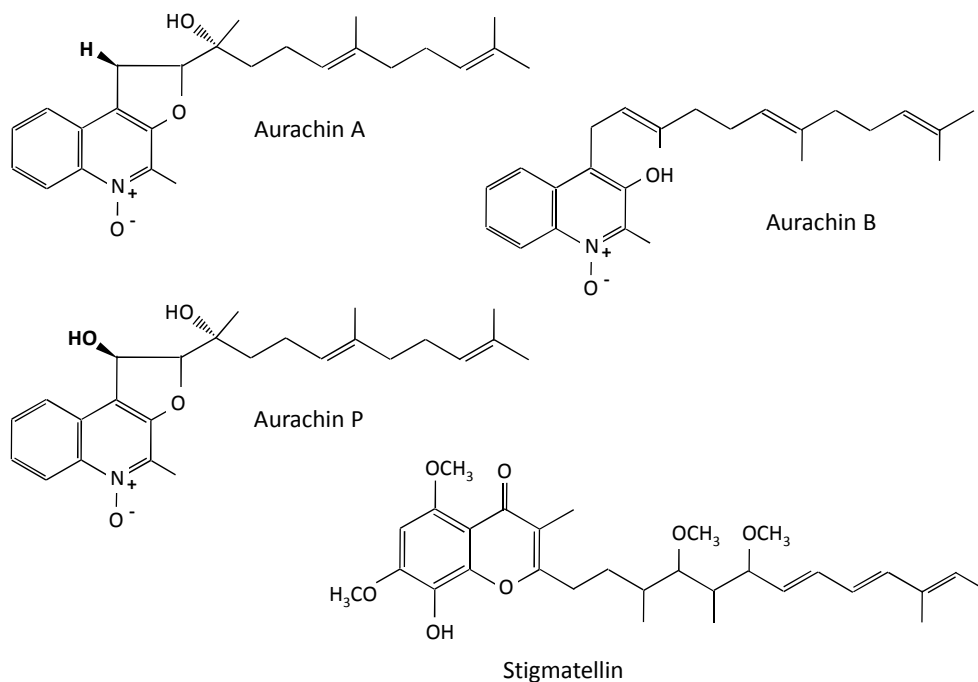


Abb.1.12: Chemische Strukturen der Aurachine A, B und P sowie von Stigmatellin (Kunze *et al.*, 1984; Kunze *et al.*, 1987; Höfle und Irschik, 2008).

1984). Bei einer ersten Beurteilung der biologischen Wirkung wurde sowohl für die Aurachine als auch für Stigmatellin eine Inhibierung der NADH-Oxidation von eukaryotischen Mitochondrien beobachtet, die auf eine Inhibierung des Elektronen-Transports der Atmungskette hindeutet (Thierbach *et al.*, 1984; Kunze *et al.*, 1987).

Stigmatellin besitzt eine ähnliche Struktur wie die Quinone, die ein essentieller Bestandteil der Zellatmung sind, indem sie den Elektronentransfer zwischen den membrangebundenen Komplexen vermitteln (Lancaster *et al.*, 2007). Eine weiterführende Untersuchung zeigte, dass Stigmatellin kompetitiv an eine Quinon-Bindungsstelle in Komplex III bindet, wodurch die Oxidation von Ubiquinol verhindert und die Elektronentransportkette unterbrochen wird (Thierbach *et al.*, 1984; von Jagow und Link, 1986; Esser *et al.*, 2004; Gurung *et al.*, 2008).

Die Zielstruktur von Aurachin A und B liegt ebenfalls innerhalb der Atmungskette. Indem Aurachin auf die katalytische Quinon-Bindungsstelle von Komplex I wirkt, wird der Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel Cluster an Ubiquinon unterbrochen (Friedrich *et al.*, 1994). Zurzeit sind jedoch weder die genaue Lokalisierung und noch die Anzahl der Quinon-Bindungsstellen in Komplex I bekannt (Verkhovskaya und Bloch, 2013).

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die fortwährende Entstehung von resistenten pathogenen Bakterien macht eine kontinuierliche Suche nach neuen Wirkstoffen erforderlich, welche durch differente Zielstrukturen die Resistenzmechanismen umgehen sollen. Die Wirkstoffkandidaten sollen spezifische Eigenschaften aufweisen, denn Antibiotika unterliegen größeren Anforderungen als herkömmliche Medikamente. So darf ein Antibiotikum keine schädigende Wirkung auf den Patienten haben, muss dabei jedoch ein größeres Spektrum an bakteriellen Krankheitserregern im ganzen Körper abtöten, da nicht immer bei Behandlungsbeginn die genaue Bakterienspezies bekannt ist (Norrby, 1990).

*S. aureus* ist ein kommensales und opportunistisch pathogenes Bakterium und eine der häufigsten Ursachen von nosokomialen und ambulant erworbenen Infektionen. Vor allem schnell auftretende resistente Stämme machen ihn zu einem schwer zu behandelnden Krankheitserreger (Deresinski, 2005; Bereket *et al.*, 2012). Aufgrund des ständigen Bedarfs an neuen Antibiotika sollten in dieser Arbeit neue Wirkstoffkandidaten hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung gegen *S. aureus* sowie ihrer zytotoxischen Wirkung gegenüber Säugetierzellen analysiert werden. Diese neuen Wirkstoffe wurden im Rahmen einer Wirkstoffsuche in einer Naturstoffbibliothek, bestehend aus myxobakteriellen Extrakten, gefunden. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Sekundärmetabolite aus dem *S. erecta* Stamm Pde77, die aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung identifiziert wurden (Abb. 1.13). Die Substanzen wurden als Stigmachronon 6, Stigmachronon 8, Stigmareson 7 und Stigmareson 19 bezeichnet und wurden in dieser Arbeit unter dem Begriff „Stigmate“ zusammengefasst.

Bei der Wirkstoffsuche wurde ein phänotyp-basiertes Hochdurchsatzverfahren verwendet, bei dem ein Krankheitserreger mit Verbindungen behandelt und bezüglich einer Wirkung auf einen ausgewählten Phänotyp analysiert wird (Zak *et al.*, 1990). Der Vorteil gegenüber einer target-basierten *in vitro*-Suche besteht darin, dass alle essentiellen Targets des Pathogens vorliegen und die antibakterielle Wirkung direkt festgestellt werden kann (Gwynn *et al.*, 2010). Da bei dieser Methode sowohl der Wirkmechanismus als auch das Target des gefundenen Wirkstoffes zufällig sind (Schenone *et al.*, 2013), war es ein weiteres Ziel in dieser Arbeit, diese zu untersuchen. Weil sich Bakterien und Säugetierzellen wesentlich voneinander unterscheiden, ist es möglich, dass der gleiche Wirkstoff in beiden Zelltypen verschiedene Zielstrukturen beeinflusst. Daher sollten Analysen sowohl mit *S. aureus* als auch mit verschiedenen Säugetierzellen durchgeführt werden.

Zuerst sollte dem Hinweis nachgegangen werden, dass die Stigmate die Zellvitalität und die Zellproliferation von Säugetierzellen reduzierten. Dies sollte anhand von Zellzyklusanalysen und Untersuchungen des mitochondrialen Membranpotentials spezifiziert werden. Die daraus resultierende Hypothese, dass die Wirkstoffe die Hemmung eines ubiquitären Biosyntheseweges verursachen, sollte im Anschluss sowohl an *S. aureus* als auch an den Zelllinien überprüft werden. Des Weiteren sollte durch die Induzierung eines resistenten Stammes in Folge einer Wirkstoffbehandlung das Genom von *S. aureus* auf Mutationen untersucht werden, die zusätzliche Hinweise auf die Zielstruktur oder den Wirkmechanismus der Stigmate liefern können.

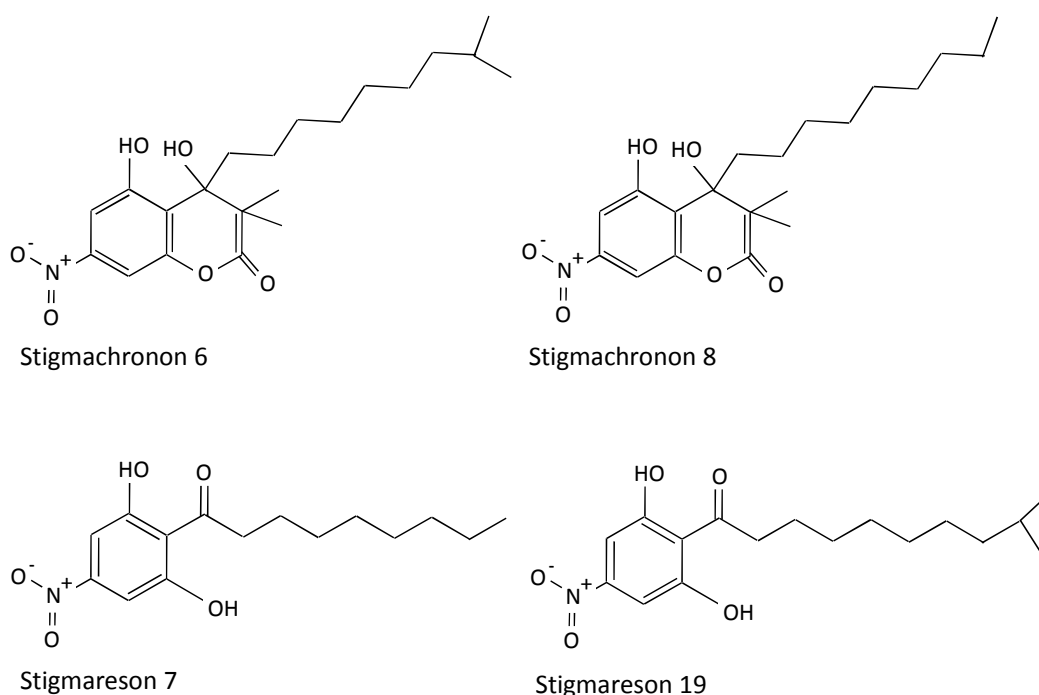


Abb. 1.13: Chemische Strukturen der Stigmate. Die Stigmate sind Sekundärmetabolite aus *Stigmatella erecta* Pde77 und besitzen eine antibakterielle Wirkung. Stigmachronon 6, Stigmachronon 8, Stigmareson 7 und Stigmareson 19 bestehen aus einer aromatischen Grundstruktur, wobei die Stigmareson-Verbindungen einen Benzolring und die Stigmachronon-Verbindungen einen Benzolring mit angeschlossenen Tetrahydropyranring besitzen. Alle Verbindungen weisen eine Nitrogruppe am fünften C-Atom des Benzols auf und haben darüberhinaus eine aus 8 bzw. 9 C-Atomen bestehende gesättigte Kohlenstoffkette.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Stämme und Säugetierzellen

Die in dieser Arbeit eingesetzten *S. aureus* Stämme sind in Tab. 2.1 und die verwendeten Säugetierzellen sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.1: Liste der verwendeten *S. aureus* Stämme.

<i>S. aureus</i> Stamm	Eigenschaft	Medium	Quelle
NCTC 8325	sequenziertes & annotiertes Genom (NC_007795)	Trypton Soja Medium	Werner Tegge, AG CBIO, HZI
klinisches MRSA-Isolat #50233094	Methicillin Resistenz	Trypton Soja Medium	Werner Tegge, AG CBIO, HZI

Tab. 2.2: Liste der eingesetzten Säugetierzellen.

Säugetierzellen	Zelltyp	Spezies	Medium	Quelle
A549	Epithelzellen aus einem Lungenkarzinom	Human	RPMI & 10 % FBS	DSMZ (ACC 107)
L929	Fibroblasten aus dem Binde- und Fettgewebe	Maus	DMEM & 10 % FBS	Bettina Hinkelmann CBIO, HZI
HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	Primäre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	Human	EGM-2	Bettina Hinkelmann CBIO, HZI

#### 2.1.2 Naturstoffe

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Naturstoffen handelt es sich um die Sekundärmetabolite Stigmachronon 6, Stigmachronon 8, Stigmareson 7 und Stigmareson 19. Diese Verbindungen wurden aus dem *Stigmatella erecta* Stamm Pde77 isoliert und von Rolf Jansen (AG MWIS, HZI) bereitgestellt. Die Stigmate wurden mit einer Konzentration von 5 mg/ml in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.1.3 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sind im Anhang B und C aufgeführt.

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

#### **BCA-Lösung A**

---

10 g/l	BCA
17,1 g/l	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
1,9 g/l	NaTartrat*2 H <sub>2</sub> O

#### **BCA-Lösung B**

---

40 g/l	CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O
--------	--

#### **Blotpuffer**

---

3,03 g/l	Tris
14,4 g/l	Glycin
3,75 ml	20 % -ige SDS Lösung

#### **Einfriermedium**

---

1 ml	RPMI 1640
10 %	FBS
5 %	DMSO

#### **Extraktionspuffer pH 7,4**

---

50 mM	Tris
25 mM	EDTA
5 %	Na-Glutamat

#### **2x Ladelösung für SDS-PAGE**

---

95 %	2x Laemmli Puffer
5 %	β- Mercaptoethanol

#### **10x PBS pH 7,4**

---

80 g/l	NaCl
2 g/l	KCl
14,4 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

**Propidiumiodid-Färbelösung**

---

50 ml	1x PBS
0,1 %	Triton X-100
10 mg	DNAsefreie RNAse
1 mg	Propidiumiodid

**10x Proteinase K Puffer**

---

100 mM	Tris-HCl
50 mM	EDTA
5 %	SDS

**SDS-PAGE Sammelgel (12,5 % Acrylamid)**

---

670 µl	Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)
1,25 ml	Upper Tris (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)
3,1 ml	H <sub>2</sub> O
25 µl	20 %-ige SDS Lösung
25 µl	10 % APS
5 µl	TEMED

**SDS-PAGE Trenngel (4 % Acrylamid)**

---

4,1 ml	Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)
2,5 ml	Lower Tris (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
3,2 ml	H <sub>2</sub> O
50 µl	20 %-ige SDS Lösung
50 µl	10 % APS
8 µl	TEMED

**50x TAE Puffer**

---

242 g/l	Tris
18,6 g/l	EDTA
5,7 %	konz. Essigsäure

**10x TBS**

---

1 M	Tris-Cl, pH 7,5
1,5 M	NaCl

**10x TBS-T**

---

1x	TBS
0,1 %	Tween-20

**1x TE Puffer pH 8,0**

---

10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA

**10x TGS pH 8,3**

---

30,25 g/l	Tris Base
144 g/l	Glycin
25 ml	20 % -ige SDS Lösung

**Trypton Soja Agar**

---

30 g/l	Trypton Soja Medium
15 g/l	Agar

### 2.1.5 Kit-Systeme zur Analyse von Säugetierzellen

Tab. 2.3: Verwendete Kit-Systeme zur Analyse tierischer Zellen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Nachweis von</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Cell Proliferation ELISA (colorimetric), BrdU Kit	Zellteilung	Roche	11647229001
Cholesterol Cell-Based Detection Assay Kit	Cholesterin	Cayman Chemical Company	10009779
FITC BrdU Flow Kit	Zellzyklus	BD Pharmingen™	559619
JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	Membranpotential der Mitochondrien	Cayman Chemical Company	10009172
ECL Select Western Blotting Detection Reagent	Immundetektion	GE Healthcare	RPN2235

### 2.1.6 Software

Tab. 2.4: Eingesetzte Software.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
AxioVision 3.1	Carl Zeiss	Aufnahme von Mikroskopbildern
Cell <sup>A</sup> 3.0	Olympus	Aufnahme von Mikroskopbildern
Excel 2007	Microsoft	Numerische Datenauswertung
Flow Jo 7.6.3	TreeStar	Analyse von FACS-Daten
Gen5 1.06	BioTek Instruments	Absorptions- und Fluoreszenzmessung
GenomicsWorkbench 6.0.2	CLC bio	Analyse von Sequenzierungsdaten
Power Point 2007	Microsoft	Graphikgestaltung
Word 2007	Microsoft	Textverarbeitung

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten unter sterilen Bedingungen**

Die im Methodenteil beschriebenen Arbeiten mit Bakterien und tierischen Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Dazu wurde das für *S. aureus* verwendete Trypton Soja Medium für 15 min bei 121 °C dampfsterilisiert, während die eingesetzten Zellkulturmedien bereits steril vom Hersteller bezogen wurden. Auch Materialien wie Pipettenspitzen, Reservoirs und Reaktionsgefäße wurden dampfsterilisiert, wohingegen Glasgefäße und Glaspipetten für 4 h bei 180 °C sterilisiert wurden.

### **2.2.2 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von *Staphylococcus aureus***

Von den *S. aureus* Stämmen wurden Glycerin-Konserven angelegt, die dauerhaft bei -80 °C gelagert wurden. Hierfür wurde das Müller Hinton Medium verwendet, welches zusätzlich 0,5 % Glukose sowie 15 % Glycerin enthielt. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden dagegen in Trypton Soja Medium durchgeführt.

Die Glycerin-Konserven wurden zur Vereinzelung von Bakterienkolonien auf Trypton Soja Agarplatten eingesetzt, welche zum Animpfen von ü.N.-Kulturen benutzt wurden. Dafür wurde eine Einzelkolonie in 200 ml Trypton Soja Medium gegeben und in einem 1 l-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 160 rpm und 37 °C ü.N. inkubiert. Mit dieser ü.N.-Kultur wurde am nächsten Tag eine Arbeitskultur mit einem Volumen von 50 ml in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben mit einer OD<sub>600</sub> von 0,01 angeimpft, die weitere 1,5 bis 2 h kultiviert wurde. Die exponentiell wachsende Arbeitskultur besaß eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1, welche zum Ansetzen der Hauptkultur verwendet wurde. Die Animpf-Platten wurden mehrmals eingesetzt und für ca. 6 Wochen bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.2.2 Hemmhofest mit *Staphylococcus aureus***

Die Methode der Hemmhofbestimmung dient zur Feststellung der bakteriellen Sensitivität gegenüber Wirkstoffen, indem über die Größe des Hemmhofes auf die Stärke des wachstumshemmenden Effekts geschlossen werden kann.

Zunächst wurden ü.N.-Kulturen vom *S. aureus* Laborstamm NCTC 8325 und dem klinischen MRSA-Isolat verwendet, um jeweils eine 100 ml Arbeitskultur in Trypton Soja Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,02 anzupflanzen. Nach 2 h Inkubation bei 37°C und 160 rpm wurden die exponentiell wachsenden Bakterien mit einer OD<sub>600</sub> von 0,01 in handwarmen Trypton Soja Agar gegeben und gut vermischt. Die Bakterien-Agar-Suspension wurde in Petrischalen gegossen und nach dem Aushärten wurde auf jeder Agarplatte mittig ein Antibiotika-Testblättchen platziert. Stigmachronon 8 und Stigmareson 7 (5 mg/ml in DMSO) wurden 1:5 in DMSO verdünnt und 10 µl der Verdünnung wurden auf ein Antibiotika-Testplättchen aufgebracht. Methicillin (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) wurde 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt und es wurden ebenfalls 10 µl der Verdünnung auf ein Testblättchen gegeben. Dies entspricht in beiden Fällen einer Wirkstoffmenge von 10 µg. Als Kontrolle wurden 10 µl des Lösungsmittels DMSO eingesetzt und der Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und am nächsten Tag wurde der Hemmhofdurchmesser bestimmt.

#### **2.2.2.3 Wachstumsanalysen von *Staphylococcus aureus* in Mikrotiterplatten**

Zur Beurteilung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) wurde das Wachstum der Bakterien unter Stoffeinfluss mit dem Wachstum von unbehandelten Bakterien verglichen. Dazu wurden die Bakterien mit verschiedenen Konzentrationen eines Wirkstoffes in Mikrotiterplatten inkubiert und das Wachstum wurde über einen bestimmten Zeitraum photometrisch dokumentiert. Der Vorteil in der Verwendung von Mikrotiterplatten besteht darin, dass eine zeitgleiche Analyse einer großen Anzahl von Proben möglich ist.

Zu diesem Zweck wurde eine *S. aureus* Kolonie von einer Agarplatte gepickt und in 200 ml Trypton Soja Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Arbeitskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,01 angeimpft und für 1,5 - 2 h bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 kultiviert, um exponentiell

wachsende Bakterien zu erhalten. Aus der Arbeitskultur wurde anschließend eine Bakteriensuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,0015 hergestellt.

Der Wirkstoff wurde je nach Bedarf im Lösungsmittel vorverdünnt und mit Trypton Soja Medium auf das Dreifache der gewünschten Konzentration eingestellt. Anschließend wurden 160 µl der Wirkstoffverdünnung in Spalte 1 einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben und die übrigen wells wurden mit 80 µl Medium aufgefüllt. Mit einer Multikanalpipette wurden 80 µl der Wirkstoffverdünnung aus Spalte 1 abgenommen und mit dem Medium in den wells von Spalte 2 vermischt. Anschließend wurden wiederum 80 µl aus Spalte 2 in Spalte 3 transferiert und vermischt. Dies erfolgte bis zur letzten Spalte, so dass eine 1:2 Verdünnungsreihe entstand. Danach wurden alle Ansätze (70 µl/ well) aus der 96-well Mikrotiterplatte in eine 100-well Honeycomb Platte überführt. Von der hergestellten Bakteriensuspension (OD<sub>600</sub> 0,0015) wurden 140 µl zu den 70 µl der Wirkstoffverdünnung gegeben, wodurch sich eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,001 ergab. Die äußeren wells der 100-well Honeycomb Platte wurden für den Versuch ausgespart und anstatt dessen mit 200 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt, um die Verdunstung im inneren Bereich der Platte zu minimieren. Jeder Ansatz wurde mindestens als Dreifachbestimmung, in der Regel aber als Vierfachbestimmung durchgeführt. Der Versuch wurde in dem Bioscreen CMBR Photometer bei 37 °C unter starkem Schütteln durchgeführt und die OD<sub>600</sub> wurde automatisch alle 20 min gemessen.

#### **2.2.2.4 Bestimmung des bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkmechanismus**

Die Einordnung einer Substanz bezüglich dessen bakterizider oder bakteriostatischer Wirkung auf einen Mikroorganismus ist eine Grundlage bei der Charakterisierung eines antibakteriellen Wirkstoffes.

Für diese Untersuchung wurde zunächst eine Kolonie des klinischen MRSA-Isolates von einer Agarplatte gepickt und in 200 ml Trypton Soja Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Arbeitskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,01 angeimpft und für 1,5 - 2 h bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 kultiviert, um exponentiell wachsende Bakterien zu erhalten. Aus der Arbeitskultur wurde anschließend eine Bakteriensuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,0015 hergestellt.

Stigmachronon 8 wurde zuerst mit DMSO verdünnt und anschließend mit Trypton Soja Medium auf die gewünschten Konzentrationen gebracht. Es wurden Konzentrationen von 10



bis 100 ng/ml verwendet, wobei immer um 10 ng/ml erhöht wurde, sowie die Konzentrationen 125, 150, 175 und 200 ng/ml. Von jeder Konzentration wurden jeweils 70 µl in 4 wells einer Honeycomb Platte gegeben und mit 140 µl der angesetzten Bakteriensuspension aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 37 °C unter starkem Schütteln im Bioscreen CMBR Photometer, wobei die OD<sub>600</sub> alle 20 min gemessen wurde. Nach 24 h wurden 50 µl pro Ansatz von den Bakteriensuspensionen, bei denen sich kein Wachstum gezeigt hatte, jeweils auf eine Trypton Soja Agarplatte ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wachstum der Bakterien dokumentiert

### **2.2.3 Gentechnische Methoden**

#### **2.2.3.1 Herstellung eines resistenten *Staphylococcus aureus* Stammes**

Zur Targetidentifizierung von Stigmachronon 8 wurde ein resistenter *S. aureus* Stamm hergestellt, dessen Genom auf Mutationen untersucht wurde, die unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 entstanden waren. Die Resistenz wurde durch eine zweimalige Behandlung des *S. aureus* NCTC 8325 Stammes mit einer 10x MIC von Stigmachronon 8 auf Trypton Soja Agarplatten erzeugt.

Zuerst wurde dafür die MIC mithilfe eines Wachstumstests bestimmt. Es wurde eine Kolonie von einer Agarplatte in 1 ml Trypton Soja Medium resuspendiert. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde auf einer Agarplatte als Backup ausgestrichen, mit der restlichen Suspension wurde eine ü.N.-Kultur in 200 ml Trypton Soja Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben angesetzt und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine 50 ml Arbeitskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,01 angeimpft und für 1,5 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert, um exponentiell wachsende Bakterien zu erhalten. Aus der Arbeitskultur wurde eine Bakteriensuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,0015 hergestellt.

Stigmachronon 8 (5 mg/ml in DMSO) wurde 1:10 im Lösungsmittel vorverdünnt und mit Trypton Soja Medium auf 4,8 µg/ml eingestellt. Anschließend wurden 160 µl der Wirkstoffverdünnung in Spalte 1 einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben und die übrigen wells wurden mit 80 µl Medium aufgefüllt. Mit einer Multikanalpipette wurden 80 µl aus Spalte 1 abgenommen und mit dem Medium in den anderen Spalten vermischt, so dass eine 1:2 Verdünnungsreihe entstand. Danach wurden alle Ansätze (70 µl/ well) aus der 96-well Mikrotiterplatte in eine 100-well Honeycomb Platte überführt. Von der hergestellten

Bakteriensuspension ( $OD_{600}$  0,0015) wurden 140  $\mu$ l zu den 70  $\mu$ l der Wirkstoffverdünnung gegeben, wodurch sich eine Start- $OD_{600}$  von 0,001 und Wirkstoffkonzentrationen von 1600 ng/ml bis 25 ng/ml ergaben. Die äußeren wells der 100-well Honeycomb Platte wurden für den Versuch ausgespart und anstatt dessen mit 200  $\mu$ l  $H_2O$  aufgefüllt, um die Verdunstung im inneren Bereich der Platte zu minimieren. Der Versuch wurde in dem Bioscreen C MBR Photometer bei 37 °C unter starkem Schütteln durchgeführt und die  $OD_{600}$  wurde automatisch alle 20 min über 24 h gemessen. Anhand der Messdaten aus diesem Versuch ergab sich für die MIC ein Wert von 50 ng/ml. Daraufhin wurden Trypton Soja Agarplatten hergestellt, die als 10x MIC eine Konzentration von 500 ng/ml Stigmachronon 8 enthielten. Eine Kolonie der zuvor als Backup hergestellten Agarplatte wurde verwendet, um zuerst eine ü.N.-Kultur und daraus wiederum eine Arbeitskultur herzustellen. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,58 wurden 40 ml der exponentiell wachsenden Bakteriensuspension in einem 50 ml-Reaktionsgefäß für 5 min bei 8000 rpm und RT abzentrifugiert und das Pellet in 3 ml 1x PBS resuspendiert. Diese Suspension besaß eine  $OD_{600}$  von 5,79. 173  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension wurden pro Stigmachronon 8 Agarplatte ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien gepickt und einzeln in 150  $\mu$ l 1x PBS resuspendiert. Die gesamte Bakteriensuspension einer Kolonie wurde auf einer Stigmachronon 8 Agarplatte ausplattiert und wiederum ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Eine Kolonie von der Stigmachronon 8 Agarplatte aus dem zweiten Durchgang wurde verwendet, um zuerst in einer Wachstumsanalyse die MIC festzustellen und im Anschluss ausreichend Zellmasse für die Isolierung genomischer DNA herzustellen. Als Kontroll-Stamm wurde eine Kolonie der Backup-Platte eingesetzt. Beide Kolonien wurden jeweils in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Zwei Mikrotiterplatten wurden einmal mit Medium und einmal mit 200  $\mu$ l 500 ng/ml Stigmachronon 8 in Trypton Soja Medium befüllt. Zuerst wurden 8 wells mit 50  $\mu$ l Bakteriensuspension angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  0,35 wurden die Bakterien aus den 8 wells verwendet, um die restlichen wells der Platte anzupflanzen und ü.N. weiter zu inkubieren. Am nächsten Tag wurden von jedem Ansatz die Bakteriensuspensionen gepoolt und die DNA isoliert (Kap. 2.2.3.2).

### **2.2.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Staphylococcus aureus***

Zur Targetidentifizierung wurde die DNA des Stigmachronon 8 resistenten *S. aureus* NCTC 8325 Stammes isoliert, um mithilfe einer Sequenzierung das Genom auf Mutationen zu

untersuchen. Dazu wurden zunächst die Bakteriensuspensionen des resistenten und des unbehandelten Stammes aus den Mikrotiterplatten getrennt gepoolt und gleichmäßig auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt (Fortsetzung Kap. 2.2.3.1). Die Zellen wurden für 5 min bei max. Geschwindigkeit und RT in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit je 1 ml 1x PBS gewaschen, ohne dass das Pellet zerstört wurde. Anschließend wurden die Bakterien in einem Wasserbad bei 80 °C für 1 h durch Hitze abgetötet. Daraufhin wurden die Zellen in Extraktionspuffer resuspendiert, in einem 50 ml-Reaktionsgefäß vereint und mit dem Extraktionspuffer auf ein Volumen von 40 ml gebracht. Es wurden ca. 30 sterile Glaskugeln (5 mm Durchmesser) zugegeben und kräftig gevortext, um die Bakterien zu vereinzeln. Zum mechanischen Aufschluss der Zellen wurde das Volumen der Zellsuspension von 40 ml auf 3 ml reduziert. Dazu wurden die Bakterien für 5 min bei 8000 rpm und RT abzentrifugiert, der Überstand abgenommen (nicht verworfen) und in 3 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in eine Lysing Matrix B tube überführt, welche bereits Silica-Kugeln (0,1 mm Durchmesser) enthielt. Mithilfe eines Mikrodismembrators wurden die Zellen für 5 min und 2000 rpm aufgeschlossen. Die 3 ml Zelllysate wurden mit den 37 ml Extraktionspuffer des Überstandes wieder vereint. Daraufhin wurden die Proteine aus dem Zelllysate entfernt. Hierfür wurde zum Zelllysate das 0,1-fache Volumen eines 10x Proteinase K Puffers zugefügt. Anschließend wurde der Ansatz mit 450 µl Proteinase K (20 mg/ml) gemischt und bei 45 °C ü.N. im Wasserbad inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Gemisch auf 2 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Es wurden jeweils 15 ml einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Lösung (25:24:1) zugegeben und die Reaktionsgefäße wurden viermal in einem Zeitraum von 30 min mehrmals invertiert. Danach wurde für 20 min bei RT und 3000 xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, ohne Bestandteile aus der unteren Phase mitzuziehen. Nach Vermischen mit 15 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde für 20 min bei RT und 3000 xg zentrifugiert und die obere wässrige Phase wurde wieder in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde das 0,1-fache Volumen einer 3 M Natriumacetat Lösung zum Überstand gegeben. Daraufhin wurden das gleiche Volumen wie die wässrige Phase Isopropanol zugefügt und durch Invertieren vermischt. Nach einer 30 min Inkubation bei -20 °C wurde für 30 min bei 3000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das DNA-Pellet mit 3 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem vollständigen Trocknen wurde zum DNA-Pellet 100 µl TE Puffer gegeben und zum Resuspendieren für mehrere Stunden bei RT stehen gelassen.

Mit einem 1 %-igen Agarose-Gel wurde die Reinheit der genomischen DNA festgestellt. Zusätzlich wurde mithilfe einer NanoDrop-Messung die Konzentration sowie die Reinheit der DNA bestimmt. Der Stigmachronon 8 resistente NCTC 8325 Stamm lag in einer Konzentration von 35 ng/µl vor und besaß beim Verhältnis 260/280 einen Wert von 1,79 sowie beim Verhältnis 260/230 einen Wert von 1,59. Der NCTC 8325 Kontroll-Stamm hatte eine Konzentration von 114 ng/µl und beim Verhältnis 260/280 einen Wert von 1,82 sowie beim Verhältnis 260/230 einen Wert von 1,96. Sowohl die DNA-Menge als auch die Reinheit waren für eine Sequenzierung ausreichend. Die genomische DNA wurde bis zur Sequenzierung bei 4 °C gelagert.

### **2.2.3.3 Sequenzierung des *Staphylococcus aureus* Genoms**

Zur Targetidentifizierung wurde das Genom des Stigmachronon 8 resistenten *S. aureus* NCTC 8325 Stammes sequenziert und mit dem Genom des Kontroll-Stammes sowie des annotierten Genoms verglichen. Durch die Detektion von möglichen Mutationen in der DNA soll auf das Target von Stigmachronon 8 geschlossen werden.

Dazu wurde die genomische DNA zur Sequenzierung und Analyse an Sabin Bhuj (AG GMAK, HZI) übergeben. Für die Sequenzierung wurde eine Bibliothek mit 700 nt langen DNA-Oligonukleotiden anhand des TruSeq (Illumina) Protokolls erstellt. Die Sequenzierung wurde mit MiSeq Illumina (paired end 250, 500 Zyklen) durchgeführt und 13,23 Millionen Messungen wurden generiert. In der folgenden Analyse wurden die Daten zuerst in der Pipeline bearbeitet und anschließend wurden im SNP calling die SNPs (small nucleotide polymorphism) des resistenten und unbehandelten NCTC 8325 Stammes mit den SNPs des annotierten Referenzstammes *S. aureus* NCTC 8325 (NC\_007795.1) abgeglichen. Des Weiteren wurde im Coverage festgestellt, dass das Genom des resistenten Stammes 921-mal und das Genom des unbehandelten Stammes 775-mal vollständig sequenziert wurde.

Die Analyse der Sequenzierung wurde mit CLC Genomics Workbench 6.0.2 durchgeführt. Die fastq-Rohdaten wurden basierend auf Qualität und Adaptern getrimmt. Die überlappenden Sequenzen wurden zuerst miteinander und anschließend mit der Referenz-Sequenz von *S. aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325 (NC\_007795) verglichen. Dazu wurden die folgenden Parameter verwendet: mismatch cost von 2, insertion cost von 3 und deletion cost von 3, mit length fraction and similarity fraction von 0,9.

Der Nachweis der SNPs wurde mithilfe von Quality-based Variant Detection durchgeführt (Parameter: neighborhood radius = 5, maximum gap and mismatch count = 2, minimum neighborhood quality = 15, minimum central quality = 20, minimum coverage = 10).

Um falsch positive SNPs auszuschließen, wurde der Parameter frequency cutoff auf 80 % eingestellt, woraufhin nur das am häufigsten auftretende Nukleotid an einer Position angezeigt wurde. Daraus sollten sich im Abgleich mit der Referenz-Sequenz (NC\_007795) und der Sequenz des sequenzierten unbehandelten *S. aureus* NCTC 8325 Stammes Punktmutationen ergeben.

#### **2.2.4 HPLC-Analyse von Metaboliten im Kulturüberstand**

Die Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) diene zur Analyse von Metaboliten und Mediumbestandteilen im Kulturüberstand von *S. aureus*. Zum einen kann der Verbrauch der Nährstoffe aus dem Medium und zum anderen die Abgabe von Stoffwechselprodukten ins Medium untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde eine *S. aureus* Kolonie von einer Agarplatte gepickt und in 200 ml Trypton Soja Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben ü.N. bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Arbeitskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,01 angeimpft und für 1,5 - 2 h bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 kultiviert, um exponentiell wachsende Bakterien zu erhalten. Es wurde eine Bakteriensuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,0015 hergestellt.

Stigmachronon 8 (5 mg/ml in DMSO) wurde auf eine Konzentration von 60 ng/ml in Trypton Soja Medium eingestellt. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an DMSO wie im Stigmachronon 8-Ansatz im Medium gelöst. Jeweils eine halbe Mikrotiterplatte wurde mit 70 µl der Stigmachronon 8-Lösung bzw. DMSO-Lösung befüllt. Anschließend wurde zu beiden Ansätzen 140 µl der hergestellten Zellsuspension hinzugefügt. Die Inkubation wurde bei 37 °C und 450 rpm im Titramax 1000 Mikrotiterplattenschüttler durchgeführt. Die Messung der OD<sub>600</sub> und die Probennahme für die HPLC-Analyse erfolgten stündlich über 7 h. Bei jeder Probennahme wurde der Inhalt von 4 wells in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gepoolt, woraus sich ein Volumen von ca. 840 µl ergab. Die Probe wurde bei 13000 rpm und RT für 5 min abzentrifugiert und der abgenommene Überstand wurde mit einem Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert, um die restlichen Bakterien zu entfernen. Die Proben wurden bis zur HPLC-Messung bei -20 °C gelagert.

Die Auftrennung der Proben per HPLC erfolgte mit einer Rezex-RoA Säule bei 60 °C und die Detektion wurde mittels Diodenarray- und Brechungsindexdetektoren vorgenommen (durchgeführt von Steffen Bernecker, AG MWIS, HZI).

## **2.2.5 Chemische Methoden**

### **2.2.5.1 Substitution einer funktionellen Gruppe mittels Hydrierung**

Die biologische Aktivität von Wirkstoffen kann durch funktionelle Gruppen vermittelt werden. Die biologische Aktivität von Stigmachronon 8 basiert möglicherweise auf der Nitro-Gruppe. Durch die Substitution einer Amin-Gruppe sollte in Toxizitätstests die Aktivität des Stigmachronon 8 Amin-Derivates analysiert werden.

Zur Herstellung des Stigmachronon 8 Amin-Derivates wurde Stigmachronon 8 an Evgeny Prusov (AG MCH, HZI) übergeben. Zur Modifizierung wurden 4,6 mg Stigmachronon 8 gelöst in 2 ml MeOH mit einem Magnetrührkern in einen 5 ml-Rundkolben mit zwei Öffnungen gegeben. Der Rundkolben wurde mit einem Drei-Wege-Absperrhahn versehen. Die Lösung wurde mit drei Wasserstoff-Reinigungszyklen unter Wasserstoff-Atmosphäre gesetzt. 1 mg Palladium-Kohlenstoff Katalysator wurde über die zweite Öffnung in den Rundkolben gegeben und das Reaktionsgemisch wurde über 2 h stark gerührt. Anschließend wurde die Lösung mithilfe von Celite® 535 filtriert und mittels HPLC/MS analysiert. Die Analyse ergab eine ca. 90 %-ige Reinheit des Stigmachronon 8 Amin-Derivates.

### **2.2.5.2 Substitution einer funktionellen Gruppe mittels Acetylierung**

In einer weiteren Substitution wurde die zuvor eingebaute Amin-Gruppe (Kap. 2.2.5.1) durch eine unreaktive Acetyl-Gruppe ausgetauscht, da bei der Amin-Gruppe eine Protonierung des freien Elektronenpaares des Stickstoffes möglich war.

Das Stigmachronon 8 Amin-Derivat wurde ebenfalls von Evgeny Prusov (AG MCH, HZI) modifiziert. Dazu wurde eine gerührte Lösung des Stigmachronon 8 Amin-Derivates (4 mg) in anhydriertem Pyridin bei 0 °C mit 3 µl Essigsäureanhydrid behandelt. Das Gemisch wurde bis zur Erwärmung auf RT und ü.N. weiter gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1 ml Dichlormethan verdünnt und mit 1 ml einer 5 % wässrigen Natriumhydrogencarbonat Lösung

abgestoppt. Die organische Phase wurde abgenommen, zweimal mit 2 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, mit 1 ml einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid Lösung versehen, mit Natriumsulfat getrocknet und abgedampft. Das verbliebene Gemisch wurde mittels HPLC-MS analysiert und ein Peak, der nahezu mit dem molekularen Ion des erwarteten Produktes übereinstimmte, wurde bei 20 min detektiert.

## **2.2.6 Kultivierung von Säugetierzellen**

### **2.2.6.1 Kultivierung der Zelllinien A549 und L929**

Die humane Lungenepithel-Zelllinie A549 und die murine Fibroblasten-Zelllinie L929 wurden in 1 ml Kryokonserven in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf in Kultur genommen. Dazu wurden die Zellen langsam aufgetaut und in 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FBS überführt. Die Zellsuspension wurde bei 200 xg und RT für 5 min abzentrifugiert und das Medium wurde abgenommen, um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FBS resuspendiert und in einer Zellkulturflasche im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Bei dem wöchentlichen Passagieren der adhärent wachsenden Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit jeweils 10 ml 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 0,5 ml Trypsin-EDTA zugegeben und für ca. 3 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin-EDTA durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FBS inaktiviert. Zum Vereinzeln der Zellen wurden diese durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren resuspendiert.

Zur Kultivierung der A549 Zelllinie wurde RPMI Medium mit 10 % FBS verwendet. Beim wöchentlichen Passagieren wurden ca. 200 µl der Zellsuspension in 10 ml Medium mit 10 % FBS (1:50) überführt und erneut bis zu einer Konfluenz von 80-90 % im Brutschrank kultiviert. Die L929 Zelllinie wurde in DMEM Medium mit 10 % FBS kultiviert. Zur Weiterführung dieser Zelllinie wurden ca. 100 µl der Zellsuspension in 10 ml Medium mit 10 % FBS (1:100) gegeben und wiederum bis zu einer Konfluenz von 80-90 % im Brutschrank aufbewahrt. Beide Zelllinien wurden maximal über 50 Wochen in Kultur gehalten.

### **2.2.6.2 Kultivierung der primären HUVEC Zellen**

Die humanen Endothelzellen HUVEC wurden von Bettina Hinkelmann (AG CBIO, HZI) in Kultur genommen und zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in 10 ml EGM-2 Medium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Bei dem wöchentlichen Passagieren der adhärent wachsenden Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit jeweils 10 ml 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 0,5 ml Trypsin-EDTA zugegeben, die überschüssige Flüssigkeit wurde wieder abgezogen und die Zellen für ca. 3 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin-EDTA durch Zugabe von 1 ml Trypsin Neutralisierungslösung inaktiviert. Zum Vereinzeln der Zellen wurden diese in 10 ml EGM-2 durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Zur Weiterführung der Zellkultur wurde 1 ml der Zellsuspension in 10 ml EGM-2 (1:10) überführt und erneut bis zu einer Konfluenz von 80-90 % im Brutschrank kultiviert. Diese Zellen wurden maximal über 8 Wochen in Kultur gehalten.

### **2.2.6.3 Aussäen von Säugetierzellen zu Versuchszwecken**

Für einen Versuch mit Säugetierzellen wurde meistens eine größere Zellanzahl benötigt, weshalb die Zellen bereits einige Tage vor Versuchsbeginn zur Vermehrung in größere Kulturgefäße überführt wurden.

Hierfür wurde vor einem Experiment eine 80-90 % konfluent bewachsene 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche verwendet, um eine größere Anzahl von Zellen heranzuziehen. Dabei wurden je nach benötigter Zellanzahl eine oder mehrere 75 cm<sup>2</sup>- oder 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen eingesetzt (Tab. 2.5). Diese Zellen wurden ebenfalls bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert und wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit der gewünschten Zellanzahl in die benötigten Kulturgefäße ausgesät. Dazu wurden die Zellen zweimal mit dem gleichen Volumen 1x PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (5 % des Medienvolumens) abgelöst. Die Reaktion wurde mit dem gleichen Volumen Medium abgestoppt, resuspendiert und die Zellanzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.



Tab. 2.5: Kulturgefäße und Medienvolumen bei der Kultivierung tierischer Zellen.

Kulturgefäß	Medienvolumen
25 cm <sup>2</sup> - Flasche	10 ml
75 cm <sup>2</sup> - Flasche	30 ml
175 cm <sup>2</sup> - Flasche	50 ml
6-well Platte	5 ml/ well
96-well Platte	200 µl / well

## 2.2.7 Analyse der Zytotoxizität

### 2.2.7.1 MTT Test

Die Zytotoxizität von Wirkstoffen auf tierische Zellen wurde mithilfe des MTT Tests bestimmt. Das Prinzip des MTT Tests beruht auf der enzymatischen Spaltung des Tetrazolium-Rings des schwach gelben 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromids (MTT), wodurch blaues Formazan entsteht, das photometrisch gemessen werden kann (Abb. 2.1). Diese Reduktion des MTT wird von intrazellulären Enzymen verursacht, die nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch im Zytoplasma und in nicht-mitochondrialen Membranen, wie dem Endosom/Lysosom Komplex, lokalisiert sind. Vorwiegend handelt es sich hierbei um NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen (Berridge *et al.*, 2005).

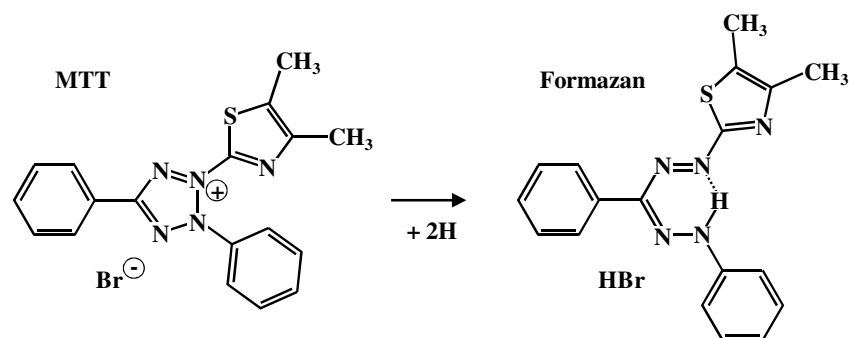


Abb. 2.1: Reduktion von MTT zu Formazan.

Für einen 1-tägigen MTT Test wurde eine Zellsuspension von  $1 \times 10^5$  Zellen/ ml hergestellt, mit der eine 96-well Mikrotiterplatte mit 120 µl/well befüllt wurde. Nach einer Inkubation von 72 h im Brutschrank wurden die zu testenden Substanzen zugeführt. Dazu wurden die Wirkstoffe zuerst mit dem Lösungsmittel vorverdünnt und mit dem jeweiligen

Zellkulturmedium wurden 1:2 Verdünnungsreihen in neuen Mikrotiterplatten hergestellt. Anschließend wurden 60 µl dieser Substanzverdünnung in die Mikrotiterplatten mit den Zellen überführt und für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert.

Für einen 5-tägigen MTT Test wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte 1:2 Verdünnungsreihen der zu testenden Substanz mit dem benötigten Zellkulturmedium hergestellt. Daraufhin wurde eine Zellsuspension mit  $5 \times 10^4$  Zellen/ ml angesetzt. Zu den 60 µl Wirkstoffverdünnung in der Mikrotiterplatte wurden direkt 120 µl der hergestellten Zellsuspension gegeben und für 5 Tage im Brutschrank inkubiert.

Nach 1 bzw. 5 Tagen wurden 20 µl einer frisch hergestellten MTT-Lösung (5 mg/ml in 1x PBS) zu den Zellen gegeben und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium ausgeschlagen und die Zellen wurden mit 100 µl 1x PBS gewaschen. Zum Lösen der entstandenen Formazan-Kristalle wurden 100 µl Isopropanol-HCl (0,4 % (v/v) 32 % HCl) zugegeben und die Platte wurde für 20 min bei RT und 650 rpm geschüttelt. Schließlich wurde die optische Dichte bei 595 nm gemessen.

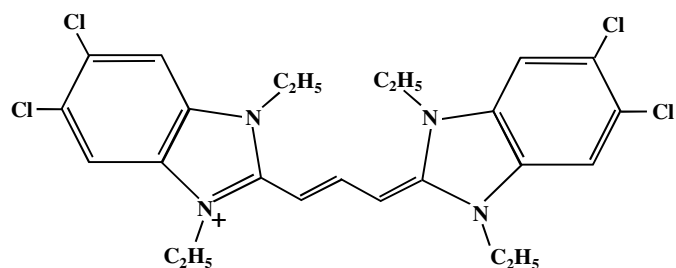
### **2.2.7.2 Mitochondriales Membranpotential**

In einem weiteren Zytotoxizitätstest wurde das mitochondriale Membranpotential (MMP) von tierischen Zellen unter Stoffeinfluss bestimmt. Dazu wurde das JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Cayman Chemical Company) verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Messung des MMPs von tierischen Zellen unter der Verwendung des kationischen und lipophilen Fluoreszenzmarkers JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin Iodid) (Abb. 2.2). JC-1 ist membranpermeabel und kann entsprechend dem aktuellen Potential in der Membran reversibel zwischen grüner und roter Fluoreszenz wechseln. Bei gesunden tierischen Zellen mit einem intakten Membranpotential fluoresziert JC-1 rot und es entstehen sogenannte J-Aggregate. Dagegen fluoresziert JC-1 grün, wenn die Zellen ein depolarisiertes Membranpotential besitzen, weil sie geschädigt oder apoptotisch sind (Cayman Chemical Company, 2012).

Die Durchführung basierte auf der Grundlage des Herstellerprotokolls und wurde leicht modifiziert. Zuerst wurden 24 h vor Versuchsstart 20 000 Zellen/ well in eine Mikrotiterplatte ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Speziell für diesen Versuch wurde eine Mikrotiterplatte mit durchsichtigem, flachen Boden sowie schwarzen Seitenwänden verwendet (Nunc MicroWell 96-Well optical bottom plate, Thermo Scientific), um eine

Für den Versuch wurde jede benötigte Wirkstoffkonzentration als einzelner Ansatz mit dem entsprechenden Zellkulturmedium in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt. Dabei wurden für eine Konzentration pro well zuerst 100 µl und später 50 µl der Suspension benötigt und der Versuch wurde mit 3 Replika durchgeführt. Falls notwendig, wurde die Stammlösung des Wirkstoffs mit dem jeweiligen Lösungsmittel vorverdünnt.

Abb. 2.2: Struktur des JC-1 Moleküls (Smiley *et al.*, 1991).



## 2.2.8 Zellzyklusanalytik

### 2.2.8.1 Zellteilung

Die DNA-Synthese von tierischen Zellen wurde untersucht, um einen eventuellen Einfluss der Naturstoffe auf die Zellteilung nachzuweisen. Hierfür wurde das Cell Proliferation ELISA (colorimetric), BrdU Kit (Roche) verwendet. Das Prinzip des Versuchs basiert auf dem Nachweis von eingebautem BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin) während der DNA-Synthese proliferierender Zellen. Das BrdU ist ein Analog zum Desoxynukleotid Thymidin und wird an dessen Stelle in die DNA inkorporiert (Abb. 2.3). Das BrdU wird anschließend mittels Antikörper nachgewiesen, welcher an eine Peroxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe des Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird ein Produkt der Peroxidasereaktion bei einer Absorption von 370 nm quantifiziert.

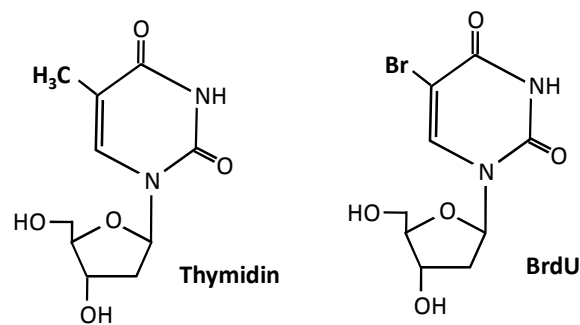


Abb. 2.3: Strukturen von dem Desoxynukleotid Thymidin und dem Analog BrdU.

Zuerst wurden 5 000 Zellen/ well in eine Mikrotiterplatte ausgesät und ü.N. im Brutschrank kultiviert. Der Wirkstoff wurde entsprechend der gewünschten Konzentrationen mit dem Lösungsmittel vorverdünnt und anschließend mit dem Zellkulturmedium verdünnt. Das Medium der ü.N.-Inkubation wurde durch 50 µl der Wirkstoffverdünnung ersetzt und die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden eine Medium-Kontrolle (mit Zellen und Medium), eine Hintergrund-Kontrolle (mit Zellen, ohne BrdU) und eine Blank-Kontrolle (ohne Zellen, mit Medium) eingesetzt. Jeder Ansatz wurde in drei Replika durchgeführt. Nach 24 h wurde das BrdU labeling reagent 1:100 mit Zellkulturmedium verdünnt und 5 µl wurden zu den 50 µl Wirkstoffverdünnung gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 10 µM BrdU ergab. Die Zellen wurden für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium vollständig abgenommen und die Zellen wurden zur Fixierung mit 100 µl kaltem FixDenat für 30 min behandelt. Nach Entfernen des FixDenat wurden 50 µl der Anti-BrdU-POD Arbeitslösung auf die Zellen

gegeben. Die Stammlösung wurde zuvor 1:100 mit der Antibody dilution solution verdünnt. Nach einer Inkubation von 90 min bei RT wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit 100 µl 1x PBS gewaschen, bevor 50 µl der Substratlösung zugegeben wurden. Nach 10 min bei RT wurde die Absorption bei 370 nm gemessen.

#### **2.2.8.2 Zellzyklusanalyse unter Verwendung von Propidiumiodid**

Der Zellzyklus tierischer Zellen wurde analysiert, um den Einfluss von Wirkstoffen auf die einzelnen Zellzyklusphasen genauer zu betrachten. In der Analyse des Zellzyklus werden die G<sub>0</sub> (Gap<sub>0</sub>)- und G<sub>1</sub> (Gap<sub>1</sub>)-Phase sowie die G<sub>2</sub> (Gap<sub>2</sub>)- und M (Mitose)-Phase zusammen betrachtet, da mit dieser Methode die Phasen nicht unterschieden werden können.

Die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase weist einen einfachen DNA-Gehalt auf, der sich im Laufe der anschließenden S (Synthese)-Phase verdoppelt. In der folgenden G<sub>2</sub>/M-Phase besitzt die Zelle einen zweifachen DNA-Gehalt bevor es zur Zellteilung kommt. Möglicherweise können schwächere Effekte nicht nachgewiesen werden, da sich die Zellen einer Kultur in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden. Zur Verstärkung der Wirkstoffeffekte wurden die Zellen vor Beginn der Behandlung durch Zugabe von Hydroxyurea synchronisiert (Ashihara und Baserga, 1979). Hydroxyurea bewirkt einen Arrest des Zellzyklus am Übergang der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase, welcher durch eine Inhibierung der Ribonukleotidreduktase entsteht. Da keine DNA mehr synthetisiert werden kann, sterben alle sich in der S-Phase befindenden Zellen und die übrigen Zellen werden synchronisiert (Yarbro, 1992).

Nach der Wirkstoffbehandlung und Fixierung der Zellen wurde der Zellzyklus mithilfe des Nukleinsäure-Interkalators Propidiumiodid (PI) untersucht, da der DNA-Gehalt einzelner Zellen durch das fluoreszierende PI über die Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Methode bestimmt werden kann. Weil PI in alle Nukleinsäuren interkaliert, also auch in RNA, würde dies die Quantifizierung der DNA-Menge verfälschen. Daher enthielt die PI-Färbelösung RNase, welche die RNA enzymatisch abbaut.

Für den Versuch wurden 4x10<sup>5</sup> Zellen/ well in eine 6-well Platte ausgesät und mit Zellkulturmedium auf ein Volumen von 5 ml gebracht. Nach einer ü.N.-Kultivierung im Brutschrank wurde das Medium durch 2,5 ml einer 1,5 mM Hydroxyurea-Zellkulturmedium-Lösung ersetzt und inkubiert (A549 Zelllinie: für 10 h bzw. 14 h; HUVEC Zellen: für 24 h). Anschließend wurde zur Entfernung des Hydroxyureas dreimal mit jeweils 2 ml 1x PBS

gewaschen und 2,5 ml Zellkulturmedium mit der gewünschten Wirkstoffkonzentration wurden hinzugefügt. Die Zeitpunkte der Probennahme richteten sich nach dem Zelltyp. Als Kontrollen dienten zu jedem Probenzeitpunkt ein Ansatz mit Medium sowie DMSO. Zur Probennahme wurde der Überstand in ein 15 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und die adhärenen Zellen wurden zweimal mit je 2 ml 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese für 2 min mit 100 µl Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert. Zum Inaktivieren des Trypsins wurden 3 ml Zellkulturmedium mit 10 % FBS zugegeben und die Zellen wurden durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren vom Boden der 6-well Platte abgelöst und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in das 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 200 xg und RT pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Zum Waschen wurde das Zellpellet in 3 ml Zellkulturmedium resuspendiert und wiederholt abzentrifugiert. Danach wurde auf das Zellpellet 0,5 ml 1x PBS gegeben. Mithilfe einer Pasteurpipette wurde die Zellsuspension zuerst kräftig resuspendiert, dann langsam in ein weiteres 15 ml-Reaktionsgefäß mit 4,5 ml eiskaltem 70 % Ethanol entlassen und ü.N. (min. aber für 2 h) bei 4 °C gelagert. Die Behandlung mit Ethanol bewirkt eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Dies bietet den Vorteil, dass die Zellen über einen längeren Zeitraum gelagert werden können.

Für die FACS Analyse wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und das 70 %-ige Ethanol wurde entfernt. Nach Resuspendieren in 5 ml 1x PBS wurde wiederum abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml der PI-Färbelösung resuspendiert und nach 30 min bei RT wurden die Proben bei Ex. 535 nm/ Em. 617 nm mit dem FACS Canto vermessen.

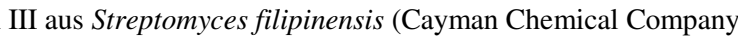
Das Protokoll zu diesem Versuch wurde basierend auf der Veröffentlichung “Determining Cell Cycle Stages by Flow Cytometry“ (Darzynkiewicz *et al.*, 2001) erstellt. Die Auswertung der Messdaten der FSC- und SSC-Detektoren sowie der PI-Fluoreszenz (PE-A) erfolgte mit der Flow Jo 7.6.3 Software.

### **2.2.8.3 Zellzyklusanalyse unter Verwendung des FITC BrdU Flow Kits**

Zusätzlich zur Analyse des Zellzyklus mithilfe von PI wurde das FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen™) eingesetzt, um detaillierter den Einfluss der Wirkstoffe auf die S-Phase untersuchen zu können. Das Prinzip des Kits beruht auf dem Einbau von BrdU in die DNA von sich teilenden Zellen, welches das gleiche Verfahren wie beim Cell Proliferation ELISA,

BrdU Kit (Roche) darstellt. Der Unterschied liegt darin, dass der hier verwendete Anti-BrdU Antikörper mit fluoreszierendem FITC (Fluorescein Isothiocyanat) konjugiert ist. Des Weiteren werden die Zellen mit dem Fluoreszenzmarker 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) behandelt, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Sowohl das Anti-BrdU-FITC als auch 7-AAD können mithilfe der FACS Methode detektiert werden. Die Verwendung dieser Farbstoff-Kombination ermöglicht die Analyse von aktiv DNA-synthetisierenden Zellen in Abhängigkeit von ihrer Position im Zellzyklus.

Für den Versuch wurden  $4 \times 10^5$  Zellen/ well in eine 6-well Platte ausgesät und mit Zellkulturmedium auf ein Volumen von 5 ml gebracht. Nach einer ü.N. Inkubation im Brutschrank wurde das Medium durch 2,5 ml einer 1,5 mM Hydroxyurea-Zellkulturmedium-Lösung ersetzt und für 10 h bzw. 14 h inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit jeweils 2 ml 1x PBS gewaschen und 2,5 ml Zellkulturmedium mit der gewünschten Wirkstoffkonzentration wurden hinzugefügt. Die Zeitpunkte der Probennahme richteten sich nach dem Zelltyp. Als Kontrollen dienten zu jedem Probenzeitpunkt ein Ansatz mit Medium sowie DMSO. Jeweils 30 min vor jeder Probennahme wurden 25 µl einer 1 mM BrdU-Lösung (verdünnt in Zellkulturmedium) zu jedem Ansatz (2,5 ml Vol.) gegeben, so dass sich eine Konzentration von 10 µM BrdU ergab. Zur Ernte wurden die adhären Zellen zweimal mit je 2 ml 1x PBS gewaschen und mit 100 µl Trypsin-EDTA behandelt. Zum Abstoppen des Trypsins wurden 3 ml Zellkulturmedium mit 10 % FBS zugegeben. Danach wurde die Zellsuspension in einem 15 ml-Reaktionsgefäß für 5 min bei 200 xg und RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Zur Lagerung ü.N. bei 4 °C wurden die Zellen mit 1 ml Staining Puffer vermischt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und mit 1 ml 1x Perm/Wash Puffer gewaschen. Nach erneutem Abfugen wurden die Zellen in 100 µl Cytoperm Permeabilization Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde wiederum 1 ml 1x Perm/Wash Puffer zugegeben und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 1x Perm/Wash Puffer wurde abzentrifugiert und das Pellet in 80 µl einer 300 µg/ml DNase Lösung für 1 h bei 37 °C behandelt. Der Verdau der DNA diente zur besseren Zugänglichkeit des eingebauten BrdUs durch den Antikörper. Anschließend wurde 1 ml 1x Perm/Wash Puffer zugegeben und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 50 µl einer Anti-BrdU-FITC Antikörper Lösung (1:50 in 1x Perm/Wash Puffer) resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Perm/Wash Puffer wurde wiederum abzentrifugiert. Im letzten Schritt vor der FACS Analyse wurden die Zellen in 20 µl der 7-AAD Lösung





jeweils 300 µl Waschpuffer für 5 min gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit einer Anti-Bleich-Lösung auf Objektträgern aufgebracht und es wurden mit dem Zeiss Axioplan Mikroskop bei einer Wellenlänge von Exc. 355nm/ Em. 460 nm Aufnahmen mit 100x mit Öl Vergrößerung angefertigt.

Zur Quantifizierung des Cholesteringehaltes wurden zunächst  $1 \times 10^4$  Zellen/ well in eine 96-well Mikrotiterplatte mit durchsichtigem, flachen Boden sowie schwarzen Seitenwänden ausgesät. Am nächsten Tag wurden 100 µl einer Wirkstoff-Zellkulturmedium-Lösung zu den Zellen gegeben. Hierbei wurde zuerst eine Verdünnungsreihe in einer weiteren 96-well Platte hergestellt, bei der die Wirkstoffe als auch das Lösungsmittel von einer Konzentration zur nächsten jeweils um 1:2 verdünnt wurden. Neben der Lösungsmittelkontrolle wurden eine Medium-Kontrolle und ein Ansatz zur Bestimmung des Hintergrundes (A549 Zellen ohne Filipin Behandlung) angesetzt. Die Wirkstoffansätze wurden in drei Replika pro Konzentration und die Lösungsmittel-Ansätze in zwei Replika pro Konzentration durchgeführt. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 50 µl Cell-Based Assay Fixative Solution für 10 min bei RT behandelt. Anschließend wurde dreimal mit jeweils 100 µl Waschpuffer für 5 min gewaschen. Das Filipin wurde 1:100 in Cholesterol Detection Assay Buffer verdünnt. Die Zellen wurden mit 30 µl der Filipin-Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit jeweils 100 µl Waschpuffer für 5 min gewaschen. Die Fluoreszenz wurde bei Exc. 355 nm/ Em. 460 nm in dem Mikrotiterplatten-Messgerät Victor 3 gemessen.

Da in den verschiedenen Ansätzen nach 48 h Behandlung mit den Wirkstoffen unterschiedliche Zellzahlen vorlagen, wurden die Zellen zur Quantifizierung der Zellzahl nach der Filipin-Färbung zusätzlich mit PI behandelt. Da PI in die DNA interkaliert und der DNA-Gehalt der Zellen prinzipiell gleich ist, sollte die Fluoreszenzintensität proportional zur Zellanzahl sein. Dazu wurden die Zellen nach der Filipin-Messung mit 50 µl PI-Färbelösung für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die PI-Färbelösung vollständig aus der Mikrotiterplatte entfernt und die Fluoreszenz des PI wurde bei Exc. 535 nm/ Em. 620 nm im Mikrotiterplatten-Messgerät Synergy™ 4 gemessen. In der Auswertung der Daten wurde nun der Fluoreszenzmesswert des Filipins von einem well durch den Fluoreszenzmesswert des PI des gleichen wells dividiert, bevor ein Mittelwert gebildet wurde. Die sich ergebenden Werte für die Lösungsmittel-Behandlung wurden anschließend 100 % gesetzt.

## **2.2.10 Proteinanalytik**

### **2.2.10.1 Wirkstoffbehandlung tierischer Zellen und anschließende Proteinextraktion**

Mithilfe eines Western Blots kann die Proteinenexpression oder auch der Phosphorylierungszustand von Proteinen analysiert werden. In diesem Fall wurde der Phosphorylierungszustand der tierischen AMP (Adenosinmonophosphat)-aktivierte Protein-kinase (AMPK) unter Wirkstoffeinfluss untersucht.

Für die Wirkstoffbehandlung wurden zunächst  $4 \times 10^5$  Zellen/ well in eine 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Wirkstoffe mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration gebracht, wobei jeweils drei Konzentrationen pro Wirkstoff und Zeitpunkt verwendet wurden. Das Medium wurde entfernt und 3 ml von der Wirkstofflösung wurde auf die Zellen gegeben und für 12 h, 24 h und 48 h im Brutschrank inkubiert. Bei der Probennahme wurden die Zellen aufgeschlossen. Dazu wurde ein Aufschlusspuffer hergestellt, indem ein Protease Inhibitor (10x in  $H_2O$ ) und ein Phosphatase Inhibitor (10x in  $H_2O$ ) in einer 1:10 Verdünnung in  $H_2O$  vermischt und auf Eis vorgekühlt wurden. Die Wirkstofflösungen wurden von den Zellen entfernt und 100  $\mu$ l der eiskalten Inhibitor-Mischung wurde auf die Zellen getropft und die Zellen wurden für 5 min auf Eis inkubiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche entfernt und die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Zelllyse wurden die Reaktionsgefäße ü.N. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellsuspensionen auf Eis aufgetaut und bei 13000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 min abzentrifugiert. Die Zellmembranbestandteile wurden hierbei pelletiert und der Überstand, welcher die wasserlöslichen Proteine enthält, wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Lagerung wurden die Proteine bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA**

Im Vorfeld des Western Blots wird der Gesamtproteingehalt der Proben bestimmt, um zur besseren Vergleichbarkeit der Proben die gleiche Proteinmenge einsetzen zu können. Die Bestimmung wurde mithilfe des Bicinchoninsäure (BCA) Tests vorgenommen (Smith *et al.*, 1985). Das Verfahren beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  bei einem basischen pH Wert von 11,25, wobei die Menge der gebildeten  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen mit der Proteinmenge in der Probe

korreliert. Die im BCA Reagenz A enthaltene Bicinchoninsäure bildet im Verhältnis 2:1 einen Chelatkomplex mit dem  $\text{Cu}^+$ -Ion (Abb. 2.5). Dieser Chelatkomplex besitzt eine violette Farbe und kann mithilfe einer Absorptionsmessung quantifiziert werden. Dafür wurde das BCA Reagenz A im Verhältnis 50:1 mit dem BCA Reagenz B gemischt, welches die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen enthielt. Als Standard wurde Lysozym (5 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) eingesetzt, mit dem eine 1:2 Verdünnungsreihe beginnend bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{g/ml}$  hergestellt wurde. Von den Proben wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  mit 95  $\mu\text{l}$  der BCA-Lösung/ well in einer Mikrotiterplatte vermischt, wodurch sich eine 1:20 Verdünnung ergab. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung angesetzt. Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Absorption bei 570 nm bestimmt wurde. Die Proteinkonzentration wurde anhand des Lysozymstandards unter Berücksichtigung des Blindwertes des Aufschlusspuffers berechnet.

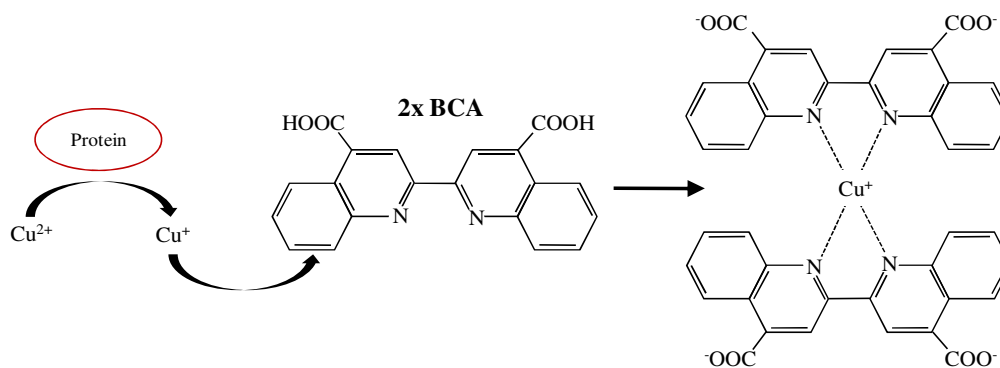


Abb. 2.5: Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA.  $\text{Cu}^{2+}$  wird von einem Protein zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches in Folge mit 2 Molekülen BCA einen Komplex bildet.

### 2.2.10.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteingemische nach ihrer Masse aufgetrennt (Laemmli, 1970). Durch Polymerisation von N'-N'-Methylen-bisAcrylamid und Acrylamid wird eine vernetzte Trägermatrix hergestellt. Bei dieser Reaktion wird N'-N'-Tetramethyldiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter eingesetzt. Das Natriumdodecylsulfat (SDS), mit dem sowohl die Gele als auch der Laufpuffer versetzt werden, bindet an Proteine und verhindert Protein-Wechselwirkungen sowie Tertiär- und Quartärstrukturen. Zusätzlich maskiert die negative Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine. Durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden des Weiteren die Disulfidbrücken reduziert. Für verschiedene Proteine sollten sich nahezu identische Ladungs-Massen-Verhältnisse und eine ähnliche

Struktur ergeben, so dass die Auftrennung allein über die molare Masse erfolgt. Die SDS-PAGE stellt ein diskontinuierliches Elektrophorese-System dar, welches aus einem kleinporigen Trenngel und einem großporigen Sammelgel besteht.

Zuerst wurde ein 12,5 %-iges Trenngel angesetzt, in eine Criterion<sup>TM</sup> Kassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min wurde das Isopropanol entfernt, ein 4 %-iges Sammelgel hergestellt, auf das Trenngel gegossen und mit einem 15-zähligen Kamm versehen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Laufkammer eingespannt, in welche 1x TGS gefüllt wurde. Die Zellextrakte wurden mit H<sub>2</sub>O auf die gleiche Proteinkonzentration sowie das gleiche Volumen eingestellt und mit einem Volumen 2x Laemmli-puffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte für 10 min bei 95 °C. Eine Tasche des Gels wurde mit 13,75 µl der Proteinlösung beladen. Als Größenstandard dienten 5 µl des Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad). Die Ankonzentrierung der Proteine erfolgte im Sammelgel für 30 min bei 80 V bis die Laufrichtung das Trenngel erreichte. Die Auftrennung im Trenngel wurde für 1,5 h bei 120 V durchgeführt.

#### **2.2.10.4 Western Blot**

Durch den Western Blot erfolgt die Immobilisierung von Proteinen an einer proteinbindenden Membran. Die Proteine sind in dieser Form für Antikörper zugänglich und werden in einer anschließenden Immundetektion spezifisch und sensitiv nachgewiesen. Beim Western Blot werden die Proteine aus dem Trenngel mittels Elektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen. Zuerst wurde das Gel für 30 min in Blotpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blot zur Verringerung ihrer Hydrophobizität in 100 % Methanol äquilibriert und anschließend mit Blotpuffer abgespült. Beim sogenannten Semidry Blot wurden unter die Membran und über das Gel zwei mit Blotpuffer äquilibrierte Filterpapiere gelegt. Das Filterpapier fungierte während des Transfers als Ionenspeicher. Bei der Elektrophorese wurde ein elektrisches Feld senkrecht zur Laufrichtung der SDS-PAGE angelegt. Auf diese Weise wurden die Proteine auf die Membran transferiert und lagen dort immobilisiert vor. Der Transfer erfolgte bei 15 V für 1 h mit Hilfe eines Elektrobotters.

### 2.2.10.5 Immundetektion

Bei der Immundetektion wird die Bindung von Antikörpern an das Zielprotein visualisiert, welches durch die Verwendung von Antikörper-Enzym-Konjugaten erfolgt. Ein konjugiertes Enzym ist z.B. die Meerrettich-Peroxidase (Horse Radish Peroxidase; HRP), die in einer chemischen Reaktion Chemilumineszenz erzeugt. In dieser Arbeit wurde eine indirekte Immundetektion durchgeführt, bei der ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper an den primären proteingebundenen Antikörper bindet. Durch Entwicklung mit einer Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Lösung erfolgte die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers. Bei der Reaktion wird enzymatisch das Substrat Luminol umgesetzt, wodurch lokal begrenzt Licht emittiert wird. Die Emission wurde mithilfe eines Bildgerätes nachgewiesen.

Tab. 2.6: Verwendete Primärantikörper.

Bezeichnung	Inkubation	Klonalität	Organismus	Hersteller
Anti-Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)	1:1000 ü.N. bei 4 °C	polyklonal	Kaninchen	Millipore # 07-681SP
Anti-AMPK $\alpha$ 1	1:1000 ü.N. bei 4 °C	polyklonal	Kaninchen	Millipore # 07-350SP
Anti-Aktin (20-33)	1:50000 1 h bei RT	polyklonal	Kaninchen	Sigma Aldrich A5060

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran 1 h bei RT in Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBS-T) geschwenkt. Nach viermaligem Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (Tab. 2.6). Im Anschluss wurden nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper durch viermaliges 10-minütiges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Membran wurde mit dem Sekundärantikörper anti-Rabbit IgG, HRP-Linked (Cell Signaling #7074; 1:3000 in TBS-T mit 5 % BSA) unter Schütteln für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch viermaliges 10-minütiges Waschen mit TBS-T entfernt. Im Anschluss wurde die Membran mit der ECL-Lösung im Verhältnis 1:1 bedeckt und mit dem Bildgerät LAS-3000 wurde die freigesetzte Lumineszenz gemessen.

Nach Detektion des Anti-phospho AMPK $\alpha$  (Thr172) Antikörpers wurden die Antikörper von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran zweimal für 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor für 15 min eine 1x ReBlot Plus Lösung zugegeben wurde. Anschließend wurde die

Membran zweimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und erneut mit Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBS-T) behandelt. Die zweite Immundetektion erfolgte mit dem Anti-AMPK $\alpha$ 1 Antikörper und die dritte Immundetektion mit dem Anti-Aktin Antikörper. Für die dritte Immundetektion wurden die Antikörper der zweiten Immundetektion nicht entfernt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Therapeutischer Index: Bakterielle Wachstumstests und Zytotoxizitätsanalysen mit Stigmaten

Das primäre Ziel in dieser Arbeit war die Charakterisierung von Wirkstoffen hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung gegenüber dem humanpathogenen Bakterium *S. aureus* als auch ihrer Zytotoxizität gegenüber Säugetierzellen. Die Beurteilung der antimikrobiellen Wirkung im Verhältnis zur Zytotoxizität ist die Basis bei der Suche nach neuen Medikamenten und wird als „therapeutischer Index“ bezeichnet. Dabei muss die antibakterielle Wirkung einer Substanz die Zytotoxizität um ein Vielfaches übertreffen, um ein Abtöten des Pathogens ohne Schädigung des Patienten zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe wurden im Rahmen eines Screenings als neue Sekundärmetabolite des Myxobakteriums *S. erecta* gefunden. Diese Naturstoffe wurden als Stigmachronon 6 und 8, sowie Stigmareson 7 und 19 bezeichnet. In einem ersten Toxizitätstest mit verschiedenen Mikroorganismen wurde eine inhibierende Wirkung auf *S. aureus* beobachtet. Infolgedessen sollte in dieser Arbeit die Toxizität dieser Naturstoffe gegenüber *S. aureus* und Säugetierzellen genauer untersucht und nach Möglichkeit der Wirkmechanismus und die Zielstruktur identifiziert werden.

Aufgrund der ähnlichen Strukturen von Stigmachronon 6 und 8 sowie Stigmareson 7 und 19 wurden die meisten Experimente in dieser Arbeit exemplarisch mit ein bis zwei Stigmaten durchgeführt, da diese Naturstoffe infolge einer arbeitsintensiven Isolierung nur begrenzt zur Verfügung standen (bereitgestellt durch B. Hinkelmann, F. Sasse, Abt. CBIO und K. Schober, R. Jansen, Abt. MWIS, HZI).

##### 3.1.1 Die Stigmate besitzen eine andere Wirkung als das $\beta$ -Laktam Antibiotikum Methicillin auf *Staphylococcus aureus*

Zur genaueren Untersuchung der antibakteriellen Wirkung der Stigmate auf *S. aureus* wurde anfangs ein Hemmhofest durchgeführt. Für dieses Experiment wurden der Laborstamm *S. aureus* NCTC 8325 und ein klinisches MRSA-Isolat sowie Stigmareson 7, Stigmachronon 8 und das  $\beta$ -Laktam Antibiotikum Methicillin verwendet (Abb. 3.1). Für den Fall, dass sich beim klinischen MRSA-Isolat unter dem Einfluss der Stigmate kein Hemmhof bildet, besteht die Möglichkeit, dass die Stigmate den gleichen Wirkmechanismus wie Methicillin besitzen.

Der NCTC 8325 Stamm zeigte mit Methicillin einen ausgeprägten Hemmhof. Eine Besonderheit war, dass dieser Hemmhof zwei Zonen besaß: In dem inneren Bereich war keinerlei bakterielles Wachstum vorhanden, wohingegen die äußere Zone ein reduziertes Wachstum von *S. aureus* zeigte. Der Durchmesser des inneren Bereiches betrug 1,5 cm, wohingegen die äußere Zone einen Durchmesser von 3 cm erreichte. Die Entstehung dieser zwei Zonen ließ sich zum einen mit einer Verringerung der Wirkstoffkonzentration im Agar erklären. Da der Wirkstoff aus dem Antibiotika-Testblättchen in den Agar diffundierte, entstand ein Wirkstoffgradient. Dies bedeutete, dass mit zunehmender Entfernung zum Testblättchen, die Wirkstoffkonzentration im Agar abnahm. Aus diesem Grund wurden die Bakterien, die sich in direkter Nähe zum Testblättchen befanden, vollständig in ihrem Wachstum gehemmt, wohingegen ab einer bestimmten Entfernung reduziertes bakterielles Wachstum möglich war. Eine weitere Erklärung für die Entstehung des Zwei-Zonen-Hemmhofes war außerdem eine schnelle Bildung von Resistenzen, für die *S. aureus* bekannt ist (Deresinski, 2005). Aus diesem Grund war möglicherweise das reduzierte Wachstum im äußeren Ring auf Bakterien zurückzuführen, die eine Resistenz gegenüber Methicillin erworben hatten.

Das mit Methicillin behandelte klinische MRSA-Isolat hingegen zeigte einen sehr schwachen Hemmhof mit einem Durchmesser von 1,2 cm. Dieses Ergebnis bestätigte, dass das klinische MRSA-Isolat eine im Vorfeld erworbene Resistenz gegenüber Methicillin besaß.

Sowohl der Laborstamm NCTC 8325 als auch das klinische MRSA-Isolat wurden mit Stigmareson 7 und Stigmachronon 8 inkubiert. Dabei entstanden bei allen Ansätzen

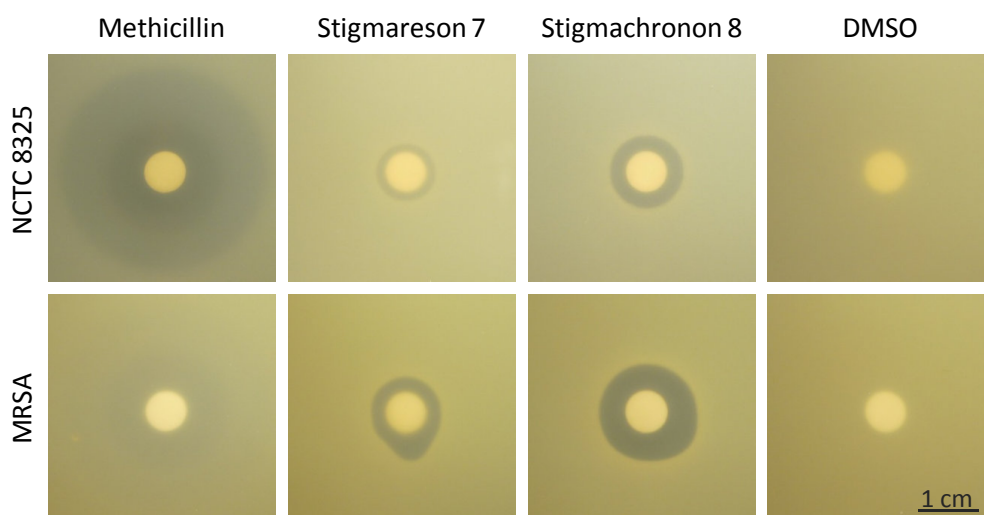


Abb. 3.1: Hemmhof test von *S. aureus* NCTC 8325 und dem klinischen MRSA-Isolat mit Methicillin, Stigmareson 7 und Stigmachronon 8. Ein Antibiotika-Testblättchen wurde auf einer Bakterien-Agarplatte platziert und mit 10 µg des jeweiligen Wirkstoffes versehen. Nach einer ü.N.-Inkubation bei 37 °C wurde der Hemmhof vermessen. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO.



Hemmhöfe mit einem Durchmesser zwischen 0,8 cm und 1,4 cm, wobei die Hemmhöfe des klinischen MRSA-Isolates im Vergleich zum Laborstamm größer waren. Des Weiteren zeigten diese Hemmhöfe ein einheitliches Erscheinungsbild, d.h. dass innerhalb des Hemmhofes das Wachstum der Bakterien vollständig gehemmt wurde und sich eine scharf abgegrenzte Linie zu den gewachsenen Bakterien ergab. Die Bakterien der DMSO-Ansätze wiesen keine Hemmung des Wachstums auf, weshalb eine Wirkung des Lösungsmittels ausgeschlossen werden konnte.

Wie bereits erwähnt, verursachten die Stigmate bei dem klinischen MRSA-Isolat Hemmhöfe, wohingegen Methicillin keine Inhibierung des klinischen MRSA-Isolates zeigte. Das deutete darauf hin, dass der Wirkmechanismus der Stigmate nicht dem Wirkmechanismus des  $\beta$ -Laktam Antibiotikums Methicillin entsprechen kann.

### **3.1.2 Die Stigmate inhibieren das *Staphylococcus aureus* Wachstum stamunabhängig in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich**

Wie bereits in einem Hemmhoftest gezeigt wurde (Abb. 3.1), bewirkten die Stigmate eine Wachstumsinhibierung von *S. aureus*. Zur weiteren Analyse wurde das bakterielle Wachstum unter dem Einfluss der Wirkstoffe über einem Zeitraum von 12 h beobachtet (Abb. 3.2). Zu diesem Zweck wurden der Laborstamm NCTC 8325 und das klinische MRSA-Isolat in Flüssigkultur mit Konzentrationen im Bereich zwischen 20 und 800 ng/ml Stigmaten inkubiert und Wachstumskurven aufgenommen.

Bei diesen Wachstumskurven war auffällig, dass die mit Stigmaten behandelten Bakterien ein verzögertes Wachstum aufwiesen. Charakteristisch war hierbei, dass der Verlauf dieser Kurven mit dem Kurvenverlauf der Medium- und DMSO-Kontrollen nahezu identisch war und das Wachstum lediglich zeitverzögert eintrat (Abb. 3.2). So wiesen fast alle Kurven eine für das Bakterienwachstum typische lag-Phase, eine log-Phase sowie eine stationäre Phase auf, soweit die Phasen im 12 h Zeitraum des Experimentes erreicht wurden. Als Erklärung für das verzögerte, aber vom Phasenverlauf identische Wachstum kamen zwei Hypothesen in Frage. Einerseits konnten die Stigmate von *S. aureus* degradiert worden sein, indem intra- oder extrazelluläre *S. aureus*-Enzyme die Stigmate zersetzten. Andererseits wäre es auch möglich, dass innerhalb einer gewissen Zeit eine Adaption der Bakterien an den

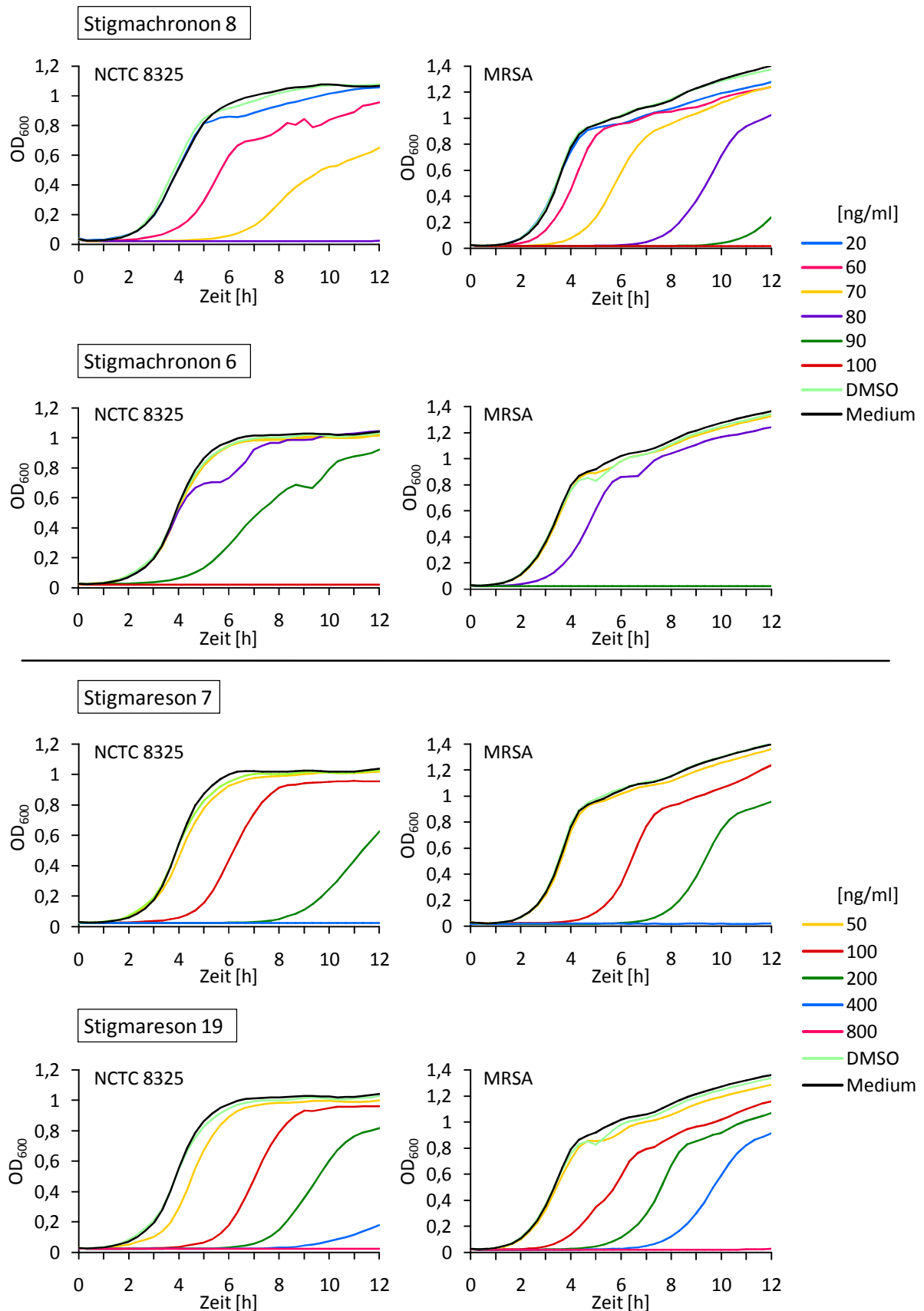


Abb. 3.2: Wachstum von *S. aureus* NCTC 8325 und des klinischen MRSA-Isolates mit Stigmaten. Die Bakterien wurden mit verschiedenen Konzentrationen Stigmachronon 8, Stigmachronon 6, Stigmareson 7 und Stigmareson 19 für 12 h bei 37°C unter Schütteln in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Die OD<sub>600</sub> wurde alle 20 min vermessen.

Wirkstoff stattfand und sehr schnell eine Resistenz gegenüber dem Wirkstoff ausgebildet wurde. Welche Hypothese nun zutraf, war mit diesem Versuchsaufbau nicht zu klären.

Bei diesem Experiment lagen die minimalen wachstumsinhibierenden Konzentrationen der Stigmate auf den NCTC 8325 Stamm und das klinische MRSA-Isolat in einem engen Konzentrationsbereich zwischen 50 und 100 ng/ml. Während Stigmachronon 8 das Wachstum von *S. aureus* NCTC 8325 bei 80 ng/ml über 12 h vollständig inhibierte, lag diese Konzentration für das klinische MRSA-Isolat bei 100 ng/ml. Stigmachronon 6 verhinderte bei einer Konzentration von 100 ng/ml das Wachstum des NCTC 8325 Stammes und bei 90 ng/ml das Wachstum des klinischen Isolates. Weiterhin wurde das Wachstum beider Stämme über 12 h bei einer Konzentration von 400 ng/ml Stigmareson 7 vollständig gehemmt. Für eine komplette Wachstumsinhibierung durch Stigmareson 19 waren jeweils 800 ng/ml Stigmareson 19 für den Laborstamm und das klinische Isolat nötig.

Diese Werte deuteten an, dass die Wirkung von einem Stigmat auf beide Stämme gleich war und sich nur leichte Unterschiede in der antibakteriellen Wirkung zwischen den Wirkstoffen ergaben. Folglich schien der antibakterielle Effekt stammunabhängig zu sein, während die geringsten wirksamen Konzentrationen der Stigmate im gleichen Bereich lagen.

Dies war aufgrund der nahezu gleichen chemischen Struktur von Stigmachronon 6 und 8 sowie Stigmareson 7 und 19 nicht unerwartet, ebenso wie auch ein identischer Wirkmechanismus und das gleiche Target für alle Stigmate wahrscheinlich wären.

### **3.1.3 Stigmachronon 8 wirkt bakterizid auf das klinische MRSA-Isolat**

Ein Aspekt zur Beurteilung der antibakteriellen Wirkung von Substanzen ist die Untersuchung, ob es sich um einen bakteriziden oder bakteriostatischen Effekt handelt. Ist ein Wirkstoff bakterizid, werden die Bakterien vollständig abgetötet. Ist dagegen ein Wirkstoff bakteriostatisch, werden die Bakterien lediglich in ihrem Wachstum gehemmt, solange die Substanz zugegen ist. Nach Entfernen des Wirkstoffes nehmen die Bakterien das Wachstum wieder auf. Per Definition soll ein bakterizider Wirkstoff über 99,9 % der Bakterien innerhalb von 18 bis 24 h abtöten. Nach dieser Definition wird ein Wirkstoff, der nur 90-99 % der Bakterien abtötet als bakteriostatisch eingeordnet. Somit ist eine eindeutige Unterscheidung in manchen Fällen schwierig, da die antibakterielle Wirkung einer Substanz nicht nur vom eingesetzten Testorganismus, sondern auch von den *in vitro* Bedingungen wie Wachstumsparametern oder Größe des Inokulums abhängig ist. Darüberhinaus ist die mikrobiologische Beurteilung nicht mit der klinischen Einschätzung eines Wirkstoffes

gleichzusetzten, da *in vitro* festgelegte Bedingungen gelten, die nicht mit der Situation *in vivo* zu vergleichen sind (Pankey und Sabath, 2004).

Für die Bestimmung der bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung von Stigmachronon 8 wurden die Bakterien zunächst über einen Zeitraum von 24 h bei 37 °C dem Wirkstoff ausgesetzt. Im Anschluss daran wurden Subkulturen der Proben, in denen kein Wachstum festgestellt wurde, auf Agarplatten ohne Wirkstoff kultiviert und das Wachstum wurde am nächsten Tag bestimmt. Hierfür wurde das klinische MRSA-Isolat zunächst mit verschiedenen Konzentrationen Stigmachronon 8 über 24 h in Mikrotiterplatten inkubiert und die OD<sub>600</sub> wurde regelmäßig bestimmt. Es wurde festgestellt, dass nach 24 h das Wachstum bei einer Konzentration von 90 ng/ml Stigmachronon 8 einsetzte. Die Bakteriensuspensionen, bei denen sich nach 24 h aufgrund der Stigmachronon 8 Behandlung noch kein messbares Wachstum gezeigt hatte, wurden auf Trypton Soja Agarplatten ausplattiert und ü.N. inkubiert. Die Agarplatten der behandelten Bakterien zeigten bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 125 ng/ml Stigmachronon 8 kein Wachstum. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass per mikrobiologischer Definition Stigmachronon 8 eine bakterizide Wirkung auf das MRSA-Isolat hat.

### **3.1.4 *Staphylococcus aureus* entwickelt schnell eine Resistenz gegenüber Stigmaten**

Aufgrund der Fähigkeit von *S. aureus* schnell neue Resistenzen auszubilden (Deresinski, 2005), wurde mit dem klinischen MRSA-Isolat untersucht, ob die Behandlung mit Stigmaten zu einer Entstehung von resistenten Stämmen führte. Da ein Merkmal für die Bildung von Resistenzen ein verbessertes bakterielles Wachstum ist, wurde für die Untersuchung dieser Fragestellung das klinische MRSA-Isolat mit verschiedenen Konzentrationen Stigmareson 7 und Stigmachronon 8 in Mikrotiterplatten inkubiert und das Wachstum über 12 h dokumentiert (Abb. 3.3). Hier ergab sich eine Inhibierung des Wachstums bei 400 ng/ml Stigmareson 7 bzw. 200 ng/ml Stigmachronon 8. Anschließend wurden die Bakterien, die bei der höchsten Konzentration gewachsen waren, ein weiteres Mal unter dem Einfluss der Stigmate auf Wachstum untersucht. Dazu wurden die Bakterien, die in der ersten Kultivierung mit 200 ng/ml Stigmareson 7 und mit 100 ng/ml Stigmachronon 8 gewachsen waren, auf neue Mikrotiterplatten verteilt. Zur Reinkultivierung enthielten die neuen Mikrotiterplatten die

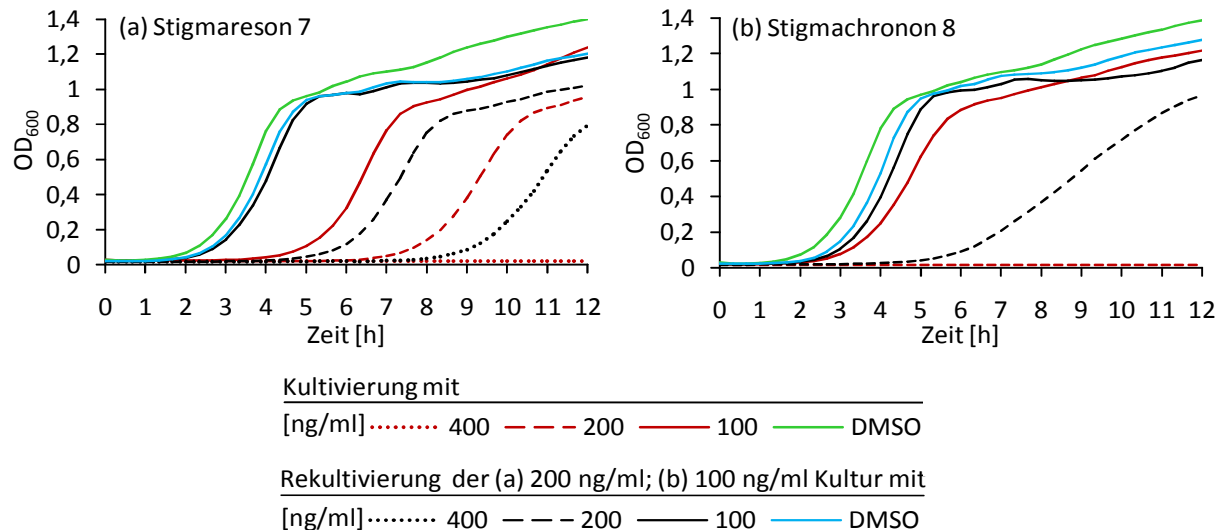


Abb. 3.3: Wachstum des klinischen MRSA-Isolates bei wiederholter Behandlung mit Stigmareson 7 und Stigmachronon 8. Jede Konzentration wurde in 8 Replika angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter starkem Schütteln in einer Mikrotiterplatte und die OD<sub>600</sub> wurde alle 20 min über 12 h vermessen.

gleichen Konzentrationen Stigmareson 7 bzw. Stigmachronon 8 wie bei der ersten Kultivierung. Während der ersten Behandlung mit Stigmareson 7 wurde das Wachstum vom klinischen MRSA-Isolat bei 400 ng/ml vollständig gehemmt, wohingegen bei der Rekultivierung mit der gleichen Konzentration das Wachstum nach 9 h einsetzte. Des Weiteren begann bei der ersten Kultivierung mit 200 ng/ml Stigmareson 7 das bakterielle Wachstum nach 7 h, wohingegen bei der zweiten Behandlung mit 200 ng/ml die Bakterien bereits nach 5 h wuchsen. Auch die Kultivierung mit 200 ng/ml Stigmachronon 8 erzielte zunächst kein Wachstum des MRSA-Isolates, im Gegensatz dazu wuchsen die Bakterien bei der Rekultivierung mit 200 ng/ml schon nach 5 h. Das Ergebnis des Versuches zeigte, dass sich das Wachstumsverhalten des klinischen MRSA-Isolates unter dem Einfluss der Stigmate bei nur einer Rekultivierung drastisch änderte. Während beispielweise bei der ersten Kultivierung das bakterielle Wachstum bei einer Konzentration der Stigmate vollständig inhibiert wurde, konnte bereits bei der ersten Rekultivierung bei der gleichen Konzentration Wachstum beobachtet werden. Es wurde angenommen, dass infolge der Behandlung mit Stigmareson 7 bzw. Stigmachronon 8 ein Resistenzmechanismus aktiviert wurde, der den Bakterien das Überleben ermöglicht.

### 3.1.5 Zytotoxizität der Stigmate auf Säugetierzellen

Für die Analyse der Zytotoxizität der Stigmate auf humane und murine Zellen wurde der MTT Test eingesetzt. Bei diesem Test wird die Zellvitalität bestimmt, indem intrazelluläre Dehydrogenasen von lebenden Zellen das zugegebene gelbe MTT zu blauem Formazan reduzieren. Sind die Zellen durch die zu testenden Wirkstoffe in ihrem Metabolismus eingeschränkt, in ihrer Zellteilung gehemmt oder bereits abgestorben, wird weniger Formazan gebildet. In Folge korreliert die Menge an gebildetem Formazan sowohl mit der Zellvitalität als auch der Zellanzahl.

Des Weiteren kann die zytotoxische Wirkung auch stark vom Zelltyp abhängig sein, weshalb für diese Analyse drei verschiedene Zellarten verwendet wurden. Hierbei handelte es sich um die humane Lungenepithel-Zelllinie A549 und die murine Fibroblasten-Zelllinie L929. Außerdem wurden die primären HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) Zellen getestet, da primäre Zellen anders als Zelllinien nicht immortalisiert sind und aufgrund ihrer ursprünglichen Eigenschaften besser die *in vivo* Situation simulieren.

Jeder Zelltyp wurde in zwei MTT Tests eingesetzt, in denen die Zellen über die Zeiträume von 1 bzw. 5 Tagen mit Stigmaten behandelt wurden. Im 1-tägigen Ansatz wurden die Stigmate auf konfluente, vitale Zellen gegeben, die ihre Zellteilung eingestellt hatten. Dagegen wurden im 5-tägigen Ansatz die Stigmate bereits beim Aussäen der Zellen beigefügt, so dass der Effekt der Wirkstoffe auf sich teilende Zellen analysiert werden konnte. Infolgedessen wurde mit dem 1-tägigen Test der Werkstoffeinfluss auf die Zellvitalität und mit dem 5-tägigen Test nicht nur die Vitalität, sondern vielmehr die Fähigkeit der Zellen zur Zellteilung analysiert.

Betrachtet man jeden MTT Test im Einzelnen, war eine sehr ähnliche Zytotoxizität der Wirkstoffe auf einen Zelltyp zu erkennen (Abb. 3.4). Dieser Effekt war vermutlich auf die nahezu identischen chemischen Strukturen der Substanzen zurückzuführen. Deutliche Unterschiede im Kurvenverlauf ergaben sich im Vergleich zwischen den Zelllinien und den primären HUVEC Zellen, wohingegen die Abweichungen zwischen den A549 und L929 Zellen nur gering waren. Beispielsweise zeigte die Zelllinie A549 nach 1 Tag Behandlung mit den Stigmaten eine um bis zu 30 % reduzierte Vitalität in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 µg/ml, wohingegen die L929-Zelllinie bis zu einer Konzentration von 2,5 µg/ml eine konstante Zellvitalität aufwies (Abb. 3.4 A und B). Im Gegensatz zu den Zelllinien wurde die Vitalität der primären HUVEC Zellen bereits bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml um 50 % reduziert (Abb. 3.4 C).

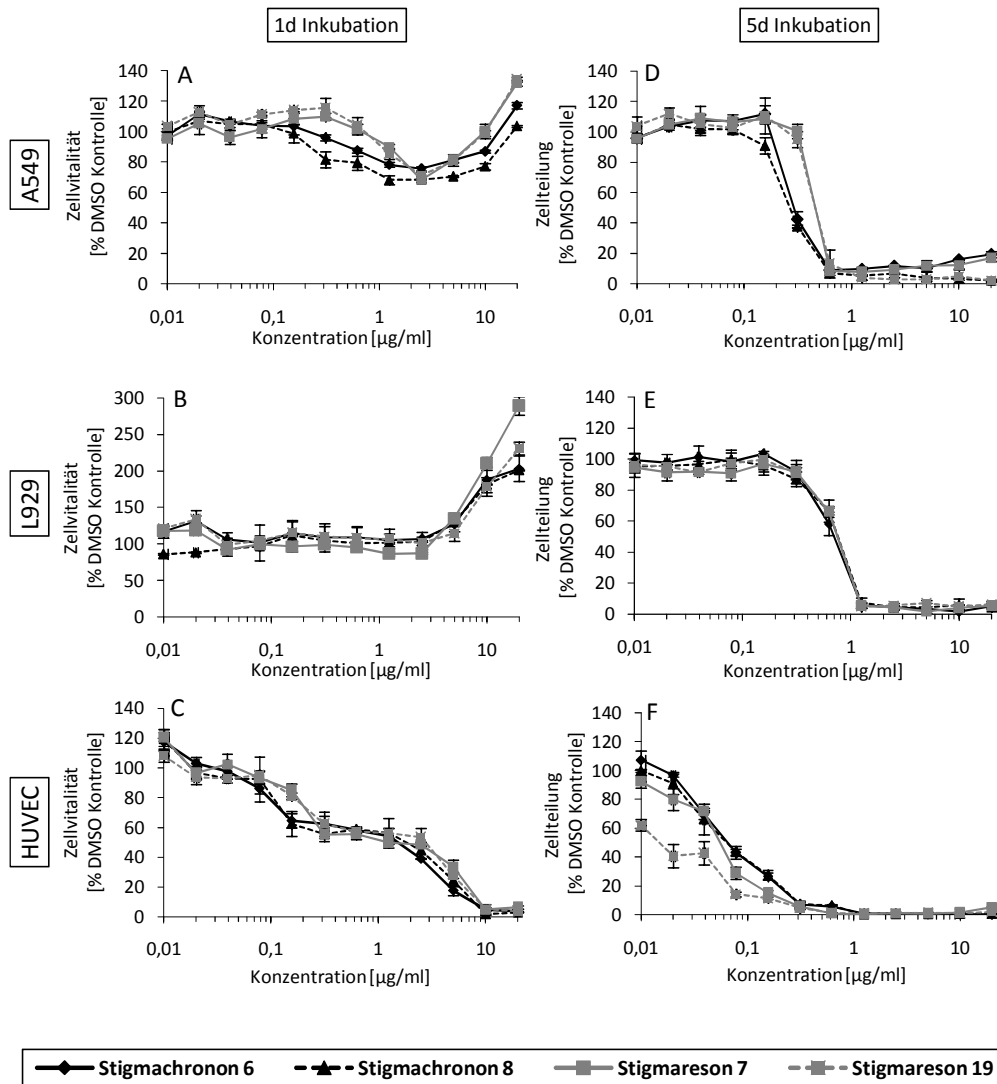


Abb. 3.4: Zytotoxizität der Stigmate auf humane und murine Zellen. In zwei MTT Tests wurden die Zelllinien A549 und L929 sowie die primären HUVEC Zellen über 1 Tag und 5 Tage mit Stigmachronon 6 und 8 sowie Stigmareson 7 und 19 behandelt. Die Standardabweichung wurde aus drei Replika ermittelt und es wurde eine Normierung mithilfe der Messwerte der DMSO-Kontrolle vorgenommen.

Nach der 5-tägigen Behandlung zeigte sich bei allen drei Zelltypen ein deutlicher Effekt der Stigmate auf die Zellzahl, aber wiederum gab es einen wesentlichen Unterschied im Kurvenverlauf zwischen den Zelllinien und den HUVEC Zellen. Die Diagramme der A549 und L929 Zellen veranschaulichen eine rapide Stagnation der Zellteilung in einer Konzentrationsspanne von lediglich 0,3 bis 1 µg/ml (Abb. 3.4 D und E). Dagegen wiesen die HUVEC Zellen von 0,01 bis 0,6 µg/ml eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl auf (Abb. 3.4 F). Eine Ausnahme bildeten die Zellen inkubiert mit Stigmareson 19, deren Messwerte um bis zu 40 % geringer ausfielen als die Messwerte der anderen Stigmat-Ansätze.

Auffällig war bei den MTT Tests mit A549 und L929 Zellen ein Anstieg der Vitalität bis über 100 %, welches auf eine Löslichkeitslimitierung der Stigmate im RPMI- und DMEM-

Medium bei Konzentrationen höher als 2,5 µg/ml zurückzuführen war (Abb. 3.4 A und B). Dagegen war bei den HUVEC Zellen kein Anstieg der Vitalität zu beobachten, weil vermutlich das EGM2-Medium aufgrund einer anderen Zusammensetzung nicht zum Ausfallen der Stigmate geführt hat. Es ist zu anzunehmen, dass zwar eine Zytotoxizität der höher konzentrierten Stigmate auf die L929 und A549 Zellen vorlag, diese aber im MTT Test nicht zu detektieren war. Das Problem der Löslichkeitslimitierung traf ebenfalls auf die 5-tägigen MTT Tests zu, hier ergaben die Messungen jedoch keinen Hinweis auf eine Vitalitätsbeeinflussung durch das Ausfallen der Stigmate. Wahrscheinlich ist, dass die Stigmate während der 5-tägigen Inkubation wieder in Lösung übergingen und die zytotoxische Wirkung erhalten blieb. Um die Stigmate vollständig in Lösung zu bringen, wäre eine Erhöhung des DMSO-Anteils im Medium notwendig gewesen. Da jedoch die Zellen bereits auf geringe Mengen DMSO im Medium mit Vitalitätsverlust reagieren, war eine Erhöhung des DMSO-Anteils nicht möglich.

### **3.1.6 Minimale inhibitorische Konzentration der Stigmate auf *Staphylococcus aureus* und Säugetierzellen**

Anhand der Wachstumskurven von *S. aureus* NCTC 8325 und dem klinischen MRSA-Isolat unter dem Einfluss der Stigmate (Abb. 3.2) wurde die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) festgestellt. Bezogen auf das bakterielle Wachstum beider Stämme lag die MIC in einem sehr engen Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,1 µg/ml (Tab. 3.1). Die Angabe von jeweils einem MIC-Wert repräsentierte das Ergebnis von einer einzelnen Wachstumsanalyse. Bei hier nicht berücksichtigten Wiederholungen kam es teilweise zu Verschiebungen der MICs, welche auf eine unterschiedliche Sensitivität der Bakterien gegenüber den Stigmaten zurückzuführen war.

In Tab. 3.2 wurde der zytotoxische Konzentrationsbereich der Stigmate auf die tierischen Zellen dargestellt, indem anhand des MTT Tests (Abb. 3.4) die MIC- und IC<sub>50</sub>-Werte (50 %-ige Inhibierung) ermittelt wurden. In einer Gegenüberstellung der verschiedenen Zelltypen ergab sich für die primären HUVEC Zellen eine um den Faktor 10 höhere Zytotoxizität als bei den Zelllinien.

Wie bereits anfangs erwähnt, ist es die wichtigste Eigenschaft für ein Medikament, das Pathogen abzutöten ohne gleichzeitig dem Patienten zu schaden. Aus diesem Grund muss die Konzentration einer Substanz, bei der eine antibakterielle Wirkung vorliegt, ein Vielfaches über der zytotoxischen Konzentration liegen. Der direkte Vergleich der MICs von *S. aureus*



und den tierischen Zellen zeigte jedoch, dass die toxische Wirkung der Stigmate gegenüber *S. aureus* und den tierischen Zellen in dem gleichen Konzentrationsbereich von 0,02 bis 0,7 µg/ml auftrat. Darüberhinaus war *S. aureus* sehr schnell in der Lage, Resistenzen gegenüber den Stigmaten auszubilden (Abb. 3.3). Aufgrund des zu geringen therapeutischen Indexes als auch der schnellen Resistenzentwicklung kamen die Stigmate folglich nicht mehr als Kandidaten für ein Antibiotikum zur Behandlung von *S. aureus* Infektionen in Frage.

Tab. 3.1: MIC der Stigmate auf das Wachstum von *S. aureus*. Die Werte basieren auf den in Abb. 3.2 dargestellten Wachstumskurven.

	MIC	
	NCTC 8325 [µg/ml]	MRSA [µg/ml]
Stigmachronon 8	0,06	0,06
Stigmachronon 6	0,09	0,08
Stigmareson 7	0,1	0,1
Stigmareson 19	0,05	0,1

Tab. 3.2: IC<sub>50</sub>- und MIC-Werte der Stigmate auf humane und murine Zellen. Die Werte wurden mithilfe der in Ab. 3.4 dargestellten MTT Tests ermittelt. Aufgrund der sehr ähnlichen Zytotoxizität der Stigmate auf einen Zelltyp, wurde für alle Stigmate ein ungefährender Konzentrationsbereich angegeben. n.d. = nicht detektiert.

	IC <sub>50</sub>			MIC	
	Zellvitalität [µg/ml]	Zellteilung [µg/ml]		Zellvitalität [µg/ml]	Zellteilung [µg/ml]
A549	n.d.	0,4	A549	0,3	0,2
L929	n.d.	0,7	L929	n.d.	0,3
HUVEC	2,5	0,06	HUVEC	0,08	0,02

### 3.2 Aufklärung des Wirkmechanismus und Identifizierung des Targets

In ersten Toxizitätsanalysen mit *S. aureus* und Zytotoxizitätstests mit humanen und murinen Zellen wurde geklärt, dass die Stigmathe nicht als Kandidaten für ein neues Antibiotikum geeignet waren. Da aber die Struktur der Stigmathe bis zu ihrer Entdeckung unbekannt war, war ebenso wenig über den Wirkmechanismus und die Zielstruktur dieser Naturstoffe bekannt. Aus diesem Grund beschäftigte sich der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit mit der Untersuchung des Targets und des Wirkmechanismus in *S. aureus* sowie in tierischen Zellen.

#### 3.2.1 Die funktionelle Nitro-Gruppe von Stigmachronon 8 bewirkt dessen biologische Aktivität auf *Staphylococcus aureus* und Säugetierzellen

Die in dieser Arbeit analysierten Stigmathe weisen alle eine Nitro-Gruppe auf, die im direkten Kontakt zu einem Aromaten steht. Es wurde vermutet, dass für die biologische Aktivität der Stigmathe diese Nitro-Gruppe notwendig ist, da diese ein negativ geladenes, reaktionsfreudiges Sauerstoffatom besitzt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Nitro-Gruppe von Stigmachronon 8 in einer Hydrierungsreaktion durch eine Amin-Gruppe substituiert, welche bei physiologischen pH-Werten ungeladen ist (Abb. 3.5). Abhängig vom pH Wert kann

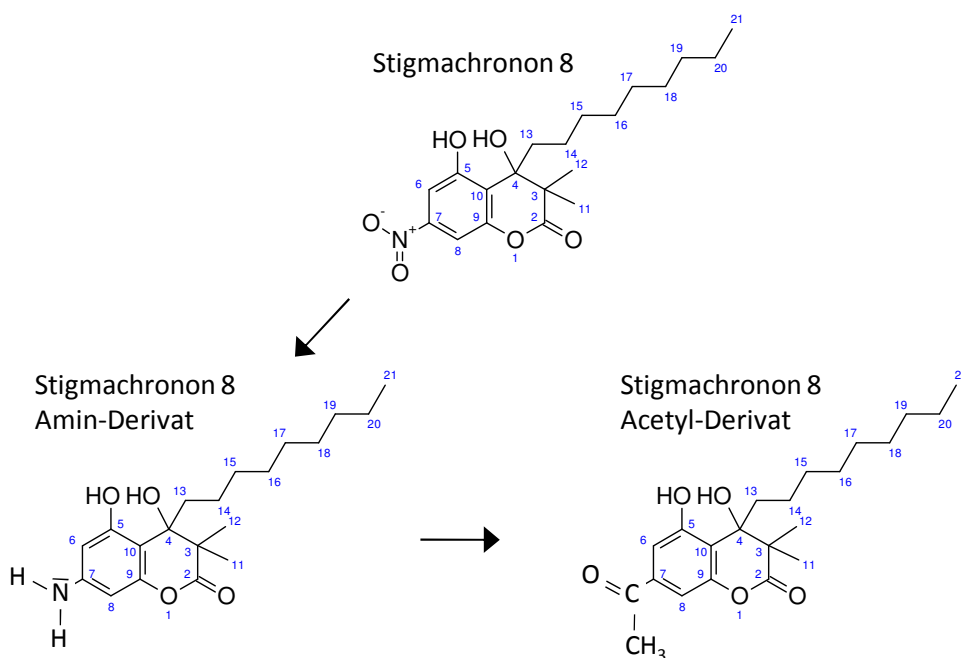


Abb. 3.5: Chemische Strukturen von Stigmachronon 8, Stigmachronon 8 Amin-Derivat und Stigmachronon 8 Acetyl-Derivat. Die Nitro-Gruppe (-NO<sub>2</sub>) wurde mittels Hydrierung durch eine Amin-Gruppe (-NH<sub>2</sub>) und die Amin-Gruppe anschließend mittels Acetylierung durch eine Acetyl-Gruppe (-COCH<sub>3</sub>) substituiert.

diese Amin-Gruppe aber basisch reagieren, indem das freie Elektronenpaar des Stickstoffes protoniert wird. Möglicherweise ist die Verbindung aufgrund der protonierten Amin-Gruppe nicht mehr membranpermeabel und der Zugang ins Zytosol wird verhindert. Aus diesem Grund wurde die Amin-Gruppe in einer weiteren Reaktion durch eine ungeladene Acetyl-Gruppe ersetzt (durchgeführt von Evgeny Prusov, AG MCH, HZI). Eine Acetyl-Gruppe ist reaktionsträge, da sowohl das Kohlenstoff-Atom als auch das Sauerstoff-Atom in dieser Verbindung ihre optimale Elektronenkonfiguration erreicht haben. Die biologische Aktivität der hergestellten Derivate wurde sowohl in Wachstumsanalysen von *S. aureus* NCTC 8325 als auch in Zytotoxizitätstests mit der A549 Zelllinie und den primären HUVEC Zellen überprüft. Die Wachstumstests von *S. aureus* NCTC 8325 wurden mit verschiedenen

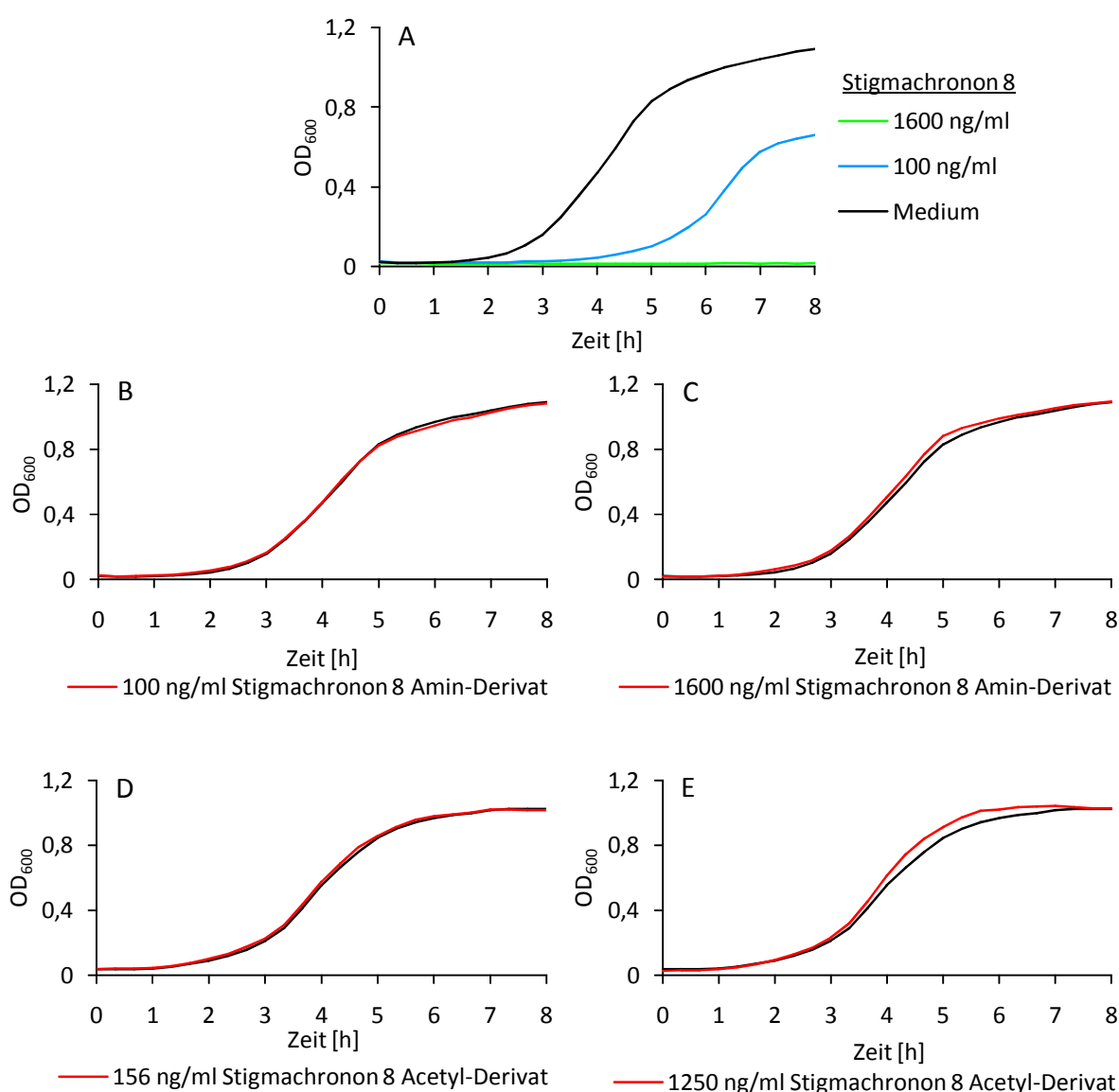


Abb. 3.6: *S. aureus* NCTC 8325 Wachstumsanalysen mit Stigmachronon 8, Stigmachronon 8 Amin-Derivat und Stigmachronon 8 Acetyl-Derivat. Jede Konzentration wurde in 4 Replika angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter starkem Schütteln in einer Mikrotiterplatte und die  $OD_{600}$  wurde alle 20 min über 8 h vermessen.

Konzentrationen Stigmachronon 8, Stigmachronon 8 Amin-Derivat und Stigmachronon 8 Acetyl-Derivat durchgeführt. In Abb. 3.6 wurden einige dieser Wachstumskurven exemplarisch dargestellt. Wie bereits in einer vorherigen Wachstumsanalyse gezeigt wurde (Abb. 3.2), setzte auch in diesem Versuch die inhibitorische Wirkung von Stigmachronon 8 in einem Konzentrationsbereich von 100 ng/ml ein. Des Weiteren war bei einer Konzentration von 1600 ng/ml das Wachstum vollständig gehemmt.

Ebenso wie mit Stigmachronon 8 wurde *S. aureus* mit den Amin- und Acetyl-Derivaten behandelt und der Einfluss auf das Wachstum untersucht. Dargestellt wurden jeweils zwei Konzentrationen pro Derivat, die mit den Konzentrationen von 100 und 1600 ng/ml Stigmachronon 8 vergleichbar waren. Sowohl die Behandlung mit dem Stigmachronon 8 Amin-Derivat (Abb. 3.6 B und C) als auch mit dem Stigmachronon 8 Acetyl-Derivat (Abb. 3.6 D und E) zeigte keine Inhibierung des Wachstums von *S. aureus*, da die Wirkstoff-Wachstumskurven exakt den gleichen Verlauf aufwiesen wie die Medium-Kontrollen. Daher konnte angenommen werden, dass für die biologische Aktivität von Stigmachronon 8 und auch die der übrigen Stigmate gegenüber *S. aureus* das Vorliegen der Nitro-Gruppe erforderlich ist.

Neben der Untersuchung der biologischen Aktivität der Derivate auf *S. aureus* wurde auch der Einfluss der Substitution der Nitro-Gruppe auf die Zytotoxizität analysiert. Zu diesem Zweck wurde der MTT Test mit der Zelllinie A549 und primären HUVEC Zellen durchgeführt (Abb. 3.7). Es konnte gezeigt werden, dass die zytotoxische Wirkung von Stigmachronon 8 durch die Substitution der Nitro-Gruppe mit einer Amin- oder Acetyl-Gruppe aufgehoben wurde. Die Zellvitalität der A549 und HUVEC Zellen war bereits bei einer Konzentration von 0,3 bzw. 0,16 µg/ml Stigmachronon 8 deutlich reduziert, wohingegen beide Derivate bei diesen Konzentrationen noch keine Auswirkungen auf die Zellen zeigten. Während die Zellteilung der A549 und HUVEC Zellen durch die Behandlung mit Stigmachronon 8 bereits bei einer Konzentration von 0,02 µg/ml bzw. 0,1 µg/ml abnahm, war dieser Konzentrationsbereich der Stigmachronon 8 Derivate für die Zellen nicht schädlich. Lediglich die höchste Konzentration von 20 µg/ml zeigte einen zytotoxischen Effekt.

Die Ergebnisse der *S. aureus* Wachstumsanalyse und der Zytotoxizitätstests unterstützten die Hypothese, dass die Nitro-Gruppe der Stigmate für die biologische Aktivität sowohl in Bakterien als auch in humanen Zellen erforderlich ist.

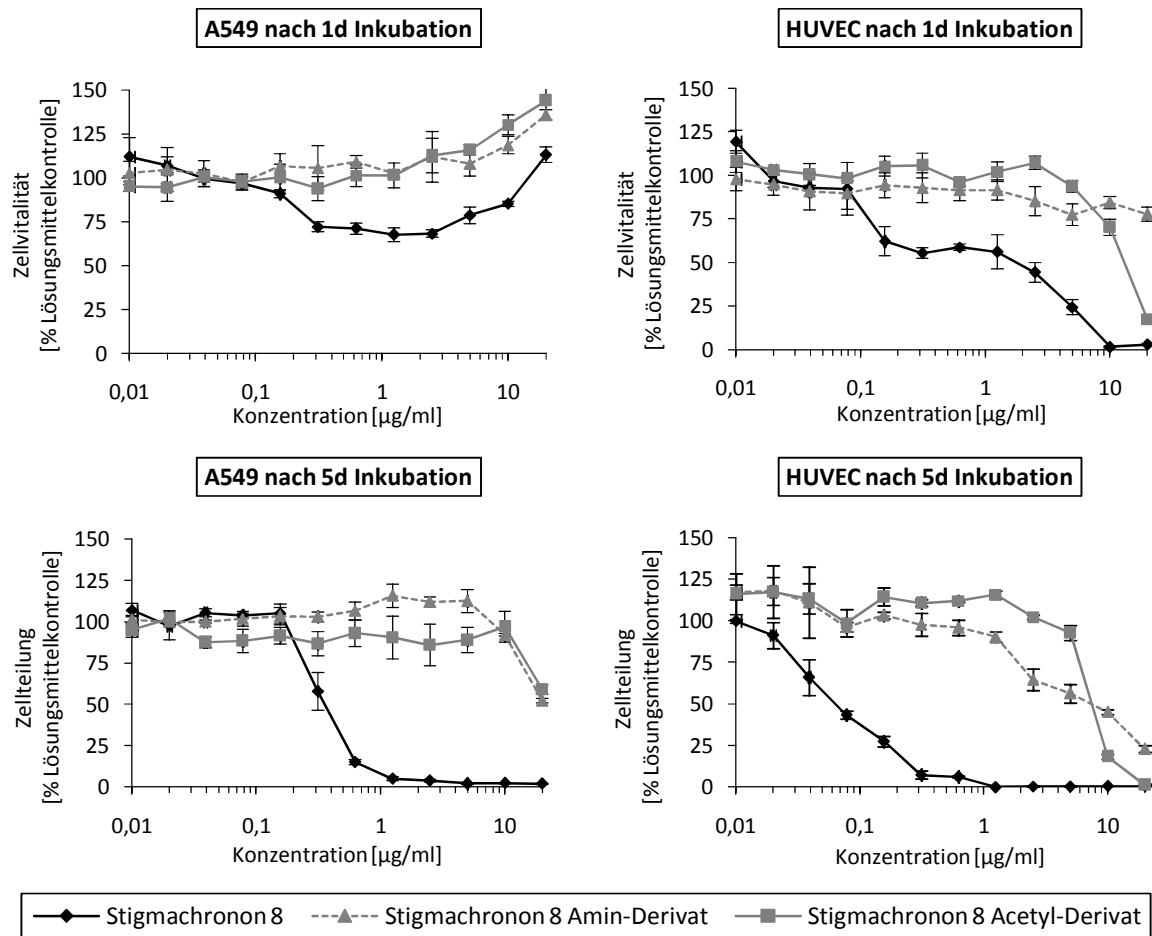


Abb. 3.7: Zytotoxizität von Stigmachronon 8, Stigmachronon 8 Amin-Derivat und Stigmachronon 8 Acetyl-Derivat auf die A549 Zelllinie und die HUVEC Zellen. In zwei MTT Tests wurden die Zellen über 1 Tag und 5 Tage mit Substanzen behandelt. Die Standardabweichung wurde aus drei Replika ermittelt und es wurde eine Normierung mithilfe der Messwerte der DMSO-Kontrolle vorgenommen.

### **3.2.2 Einfluss der Stigmate auf das Membranpotential von tierischen Mitochondrien**

Die Stigmate wiesen eine schädigende Wirkung auf die Vitalität von tierischen Zellen auf, welches in MTT Tests gezeigt werden konnte (Abb. 3.4). Allerdings wurde mit dem MTT Test die allgemeine Vitalität der Zellen bestimmt, da der Test den Umsatz von MTT durch verschiedene intrazelluläre Enzyme, wie NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen, anzeigt. Diese Enzyme sind im Zytoplasma und in mitochondrialen sowie nicht-mitochondrialen Membranen lokalisiert (Berridge *et al.*, 2005). Um einen weiteren Einblick in die Wirkung der Stigmate zu erhalten, wurde das „JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit“ (Cayman Chemical) eingesetzt. Das mitochondriale Membranpotential  $\Delta\psi_m$  (MMP) ist ebenfalls ein Maß für die Zellvitalität, jedoch spezifischer als der MTT Test, da ausschließlich die Funktionalität der Mitochondrien analysiert wird. Darüberhinaus übernehmen die Mitochondrien eine zentrale Rolle im Apoptose-Signalweg (Green und Reed, 1998), weshalb mit diesem Versuch auch der Nachweis von apoptotischen Zellen möglich ist. Der verwendete kationische, lipophile JC-1 Farbstoff gelangt in die Mitochondrien und fluoresziert bei einem intakten MMP rot oder bei einem depolarisierten MMP grün. Beide Fluoreszenzen wurden quantitativ gemessen und zusätzlich mikroskopisch dokumentiert.

#### **3.2.2.1 Das mitochondriale Membranpotential der A549 Zelllinie wird unter dem Einfluss der Stigmate inhibiert**

In einem ersten Experiment wurde das MMP der humanen Zelllinie A549 unter dem Einfluss von Stigmareson 7 und Stigmachronon 8 analysiert (Abb. 3.8). Zur Orientierung für den verwendeten Konzentrationsbereich dienten die Daten des MTT Tests (Abb. 3.4).

Anstatt einer Inkubationszeit von 1 bzw. 5 Tagen wie beim MTT Test, betrug bei diesem Versuch die Behandlungsdauer mit Stigmaten lediglich 1 h. Dies war bereits ausreichend, um einen Effekt der Stigmate auf die A549 Zellen nachweisen zu können. Damit zeigte sich, dass die Zellen in einem sehr kurzen Zeitraum auf die Behandlung reagierten und diese Reaktion ebenso kurzfristig in einem MMP Test detektiert werden konnte.

In dem Diagramm ist eindeutig zu erkennen, dass das MMP der A549 Zellen mit steigender Wirkstoffkonzentration stärker depolarisiert wurde. Weiterhin war das MMP der A549 Zellen unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 tendenziell geringer (10-20 %) als bei den Stigmareson 7-Proben, wobei sich dieser Unterschied mit steigender Wirkstoffkonzentration ausglich. Dieser geringe Zytotoxizitätsunterschied zwischen Stigmachronon 8 und

Stigmareson 7 konnte bereits im anfänglichen MTT Test beobachtet werden (Abb. 3.4). Ab einer Konzentration von 5000 ng/ml lag das MMP unterhalb von 10 %, weshalb anzunehmen war, dass die Zellen apoptotisch waren.

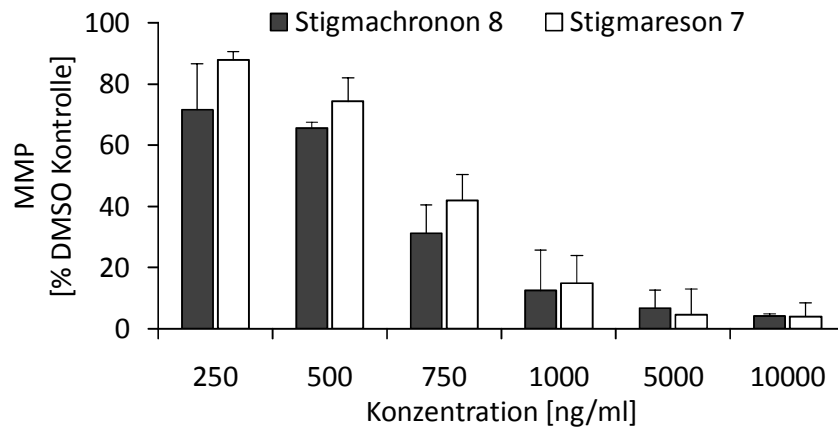


Abb. 3.8: MMP der A549 Zelllinie unter dem Einfluss von Stigmareson 7 und Stigmachronon 8. Nach 30 min Behandlung mit Stigmaten wurde für weitere 30 min zusätzlich mit JC-1 gefärbt. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, das der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe eingesetzt wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

### 3.2.2.2 Der Kurzzeiteffekt von Stigmachronon 8 auf das mitochondriale Membranpotential der A549 Zelllinie ist konzentrationsgebunden aber zeitunabhängig

Es wurde gezeigt, dass die Stärke der Zytotoxizität mit der Menge des eingesetzten Wirkstoffes korreliert (Abb. 3.8). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Depolarisierung des MMP der mit Stigmaten behandelten Zellen in einem Zusammenhang mit der Behandlungsdauer steht. Im vorherigen Versuch wurden die A549 Zellen für 1 h behandelt und es konnte bereits eine Wirkung nachgewiesen werden. Daher wurden in diesem MMP Test die Inkubationszeiten mit Stigmachronon 8 auf 3 h, 6 h und 24 h verlängert, um einen Überblick über den zeitlichen Toxizitätsverlauf zu erhalten (Abb. 3.9).

Wie angenommen, nahm das MMP bei allen drei Inkubationszeiten mit steigender Wirkstoffkonzentration kontinuierlich ab. Dieser Sachverhalt konnte bereits im vorherigen Experiment beobachtet werden (Abb. 3.8). Entgegen der Erwartung konnte jedoch keine stärkere Depolarisierung des MMP in Zusammenhang mit einer verlängerten Inkubationszeit beobachtet werden. Sowohl nach 3 h, 6 h und 24 h wurde das MMP der Zellen bei der gleichen Konzentration ähnlich stark depolarisiert. Dieser Versuch zeigte, dass

Stigmachronon 8 in einem Zeitraum von 24 h einen konzentrationsabhängigen, aber keinen zeitgebundenen Effekt auf die A549 Zelllinie hatte.

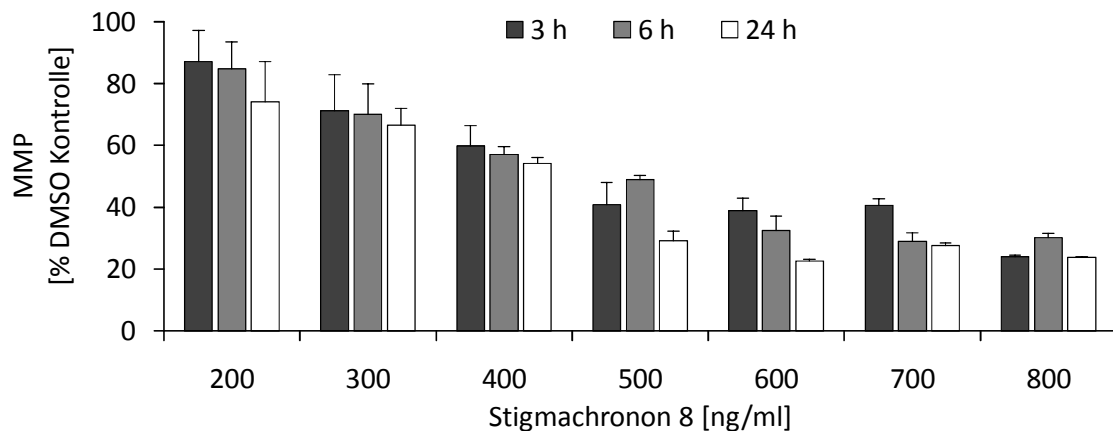


Abb. 3.9: MMP der A549 Zelllinie unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 über verschiedene Zeiträume. Nach 3 h, 6 h, und 24 h Inkubation mit Stigmachronon 8 wurde für weitere 30 min zusätzlich mit JC-1 gefärbt. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, welches der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe eingesetzt wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

### 3.2.2.3 Die Vitalität der A549 Zelllinie wird durch den Einfluss von Stigmachronon 8 stärker beeinträchtigt als die Vitalität der L929 Zelllinie

Die Gemeinsamkeit zwischen den A549 Zellen und den L929 Zellen ist, dass beide Zelllinien immortalisiert sind und sich daher unbegrenzt teilen können. Ansonsten unterscheiden sich beide Zelllinien in vielerlei Hinsicht. Bei den A549 Zellen handelt es sich um humane alveolare Epithelzellen, die aus einem Tumor isoliert wurden (Giard *et al.*, 1973). Dagegen sind die murinen L929 Zellen Fibroblasten und stammen aus dem Binde- und Fettgewebe (Earle *et al.*, 1943).

In zwei weiteren MMP Tests wurde die Wirkung von Stigmachronon 8 auf beide Zelllinien analysiert und miteinander verglichen (Abb. 3.10). Im MTT Test konnte bereits eine ähnliche Zytotoxizität der Stigmate auf beide Zelllinien beobachtet werden (Abb.3.4). Auf diesem Ergebnis basierte die Hypothese, dass das MMP beider Zelllinien auf die Stigmachronon 8-Behandlung vergleichbar reagieren würde. Anders als erwartet zeigte sich nur ein geringer Effekt auf das MMP der L929 Zelllinie, während das MMP der A549 Zellen mit steigender Stigmachronon 8-Konzentration kontinuierlich depolarisiert wurde. Beispielsweise verringerte sich das MMP der L929 Zellen bei einer Konzentration von 1000 ng/ml Stigmachronon 8 lediglich um 30 %, wohingegen das MMP der A549 Zellen bei dieser



Konzentration um 90 % depolarisiert wurde. Eine Abweichung in der Messreihe der L929 Zellen ergab sich bei einer Konzentration von 750 ng/ml Stigmachronon 8. Bei dieser Messung wurde eine Steigerung des MMP auf etwa 140 % festgestellt, welches nicht mit den übrigen Daten übereinstimmte und daher als Messfehler gewertet wurde. Vermutlich handelte es dabei sich um ein Artefakt des JC-1 Farbstoffes.

Anhand dieses Experiments wurde beobachtet, dass Stigmachronon 8 das MMP der L929 Zelllinie kaum beeinflusste, wohingegen das MMP der A549 Zelllinie stark depolarisiert wurde.

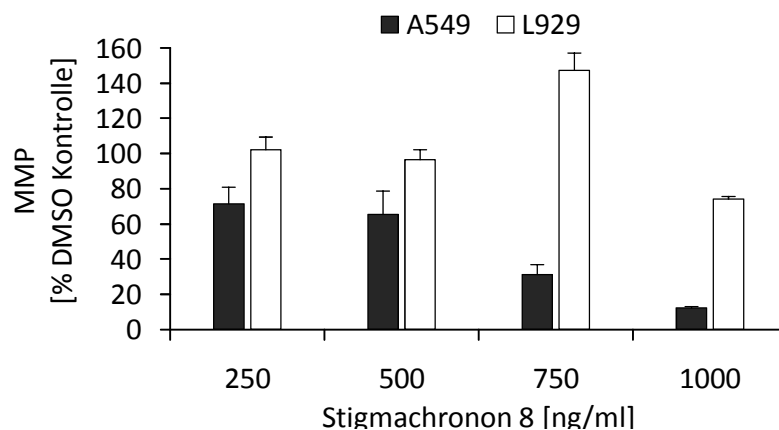


Abb. 3.10: MMP der A549 und L929 Zelllinien unter dem Einfluss von Stigmachronon 8. Nach 30 min Inkubation wurde für weitere 30 min mit JC-1 gefärbt. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, welches der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe verwendet wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

#### 3.2.2.4 Die Wirkung von Stigmachronon 8 ist reversibel auf die A549 Zelllinie und irreversibel auf die primären HUVEC Zellen

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnt, wurde mithilfe des JC-1 Farbstoffes das MMP analysiert, welches als ein Maß für die Zellvitalität angesehen werden kann. Zusätzlich können mit diesem Experiment auch apoptotische Zellen nachgewiesen werden, da die Mitochondrien am Apoptose-Signalweg beteiligt sind (Green und Reed, 1998). Allerdings war es nicht eindeutig, ob bei einem MMP von beispielsweise 20 % oder geringer, die Zellen lediglich in ihrer Vitalität stark geschwächt waren und noch lebten oder bereits tot waren.

Aus diesem Grund wurde die Durchführung des Versuchs an diese Fragestellung angepasst. Zunächst wurden die A549 Zellen über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Stigmachronon 8 inkubiert. In der angepassten Versuchsdurchführung wurde nun während der

30-minütigen Inkubation lediglich JC-1 in RPMI ohne Wirkstoff zu den Zellen gegeben. Dadurch hatten die Zellen nach 24 h Vorbehandlung mit Stigmachronon 8 eine 30-minütige Erholungsphase, bevor das MMP gemessen wurde. Die Messungen des MMPs der A549 Zellen 30 min ohne Stigmachronon 8 wurden mit den Messungen des MMPs mit Stigmachronon 8 verglichen (Abb. 3.11).

Nach der Quantifizierung der Fluoreszenz wurde diese zusätzlich mikroskopisch dokumentiert (Abb. 3.12). Der Ansatz mit Stigmachronon 8 zeigte, dass mit einem Anstieg der Stigmachronon 8-Konzentration sich die grüne Fluoreszenz der geschädigten Zellen verstärkte und die rote Fluoreszenz sich dementsprechend verringerte.

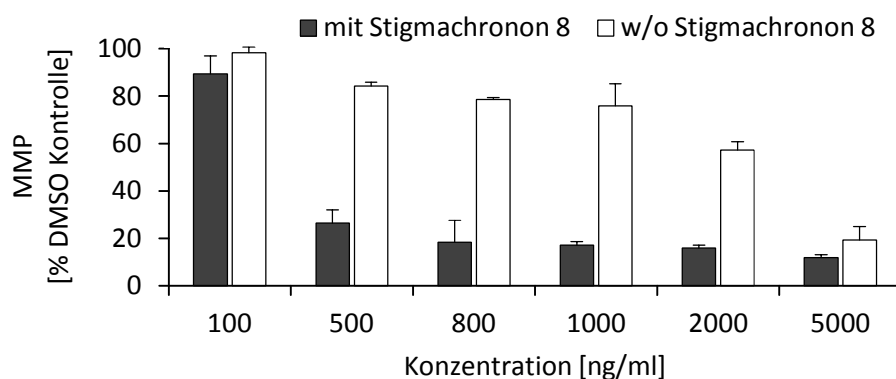


Abb. 3.11: MMP der A549 Zelllinie nach Entfernung von Stigmachronon 8. Nach 24 h Vorinkubation wurde bei der „w/o Stigmachronon 8“-Messreihe Stigmachronon 8 durch Medium ersetzt, während bei der „mit Stigmachronon 8“-Messreihe Stigmachronon 8 bei der 30-minütigen JC-1 Färbung vorhanden war. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

Im Gegensatz dazu war beim Ansatz w/o Stigmachronon 8 die rote Fluoreszenz der gesunden Zellen noch bei höheren Stigmachronon 8-Konzentrationen zu erkennen. Diese Beobachtungen spiegelten sich noch deutlicher in den Messwerten wieder (Abb. 3.11). Die Daten zeigten einen drastischen Unterschied zwischen beiden Ansätzen, die eindeutig belegten, dass Zellen mit einem MMP von 20 % nicht zwangsläufig apoptotisch waren. Eine Zeitdauer von nur 30 min ohne Wirkstoff war ausreichend, dass das MMP der Zellen wieder auf bis zu 80 % anstieg. So war der Effekt von Stigmachronon 8 zwischen 500 und 2000 ng/ml und einer Inkubationszeit von 24 h auf das MMP der A549 Zellen reversibel. Eine Konzentration von 100 ng/ml Stigmachronon 8 hatte bei beiden Ansätzen keine schädliche Wirkung. Dagegen war das MMP der Zellen mit einer Stigmachronon 8 Konzentration von

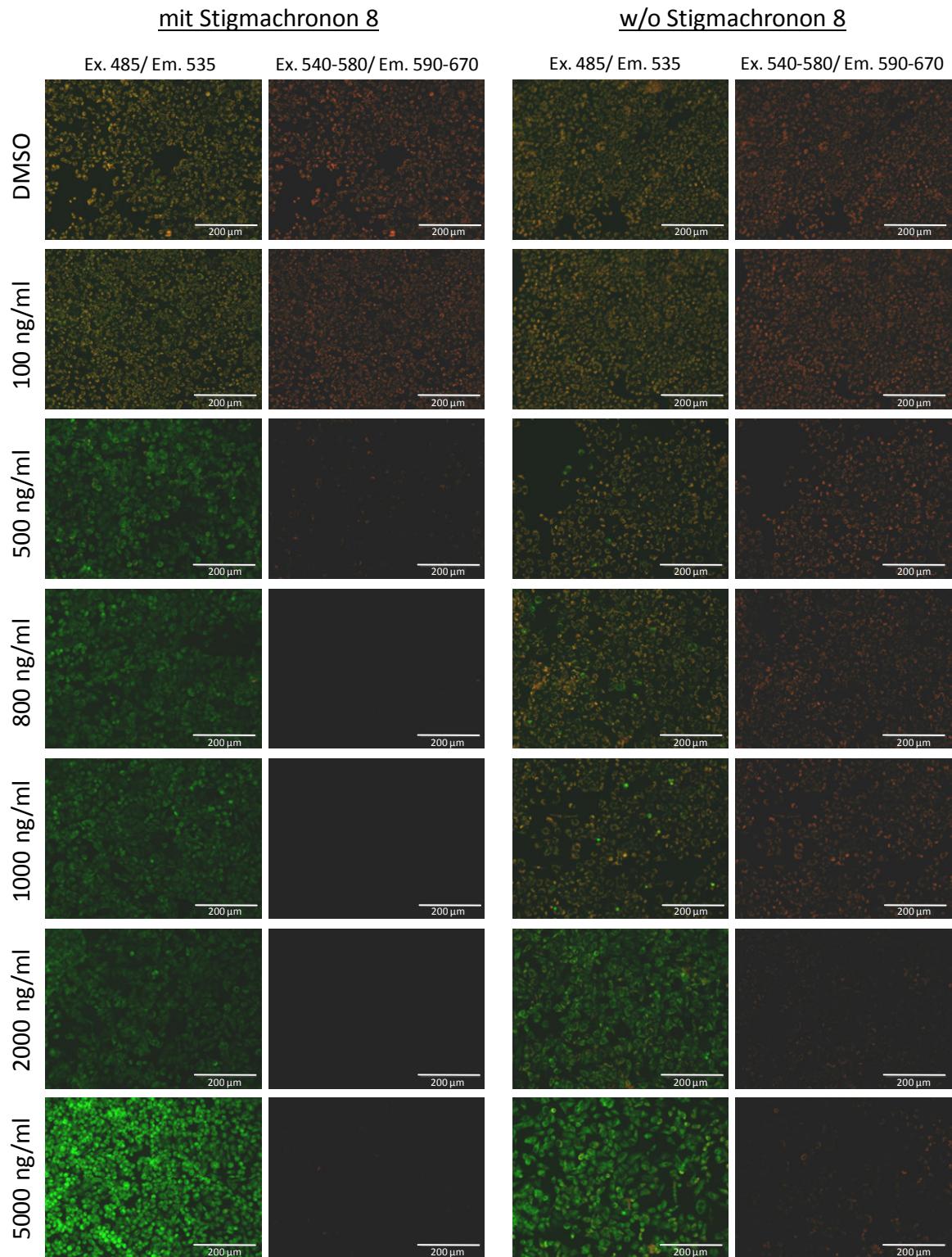


Abb. 3.12: Mikroskopaufnahmen zum MMP der A549 Zelllinie nach Entfernung von Stigmachronon 8. Nach 24 h Vorinkubation wurde bei der „w/o Stigmachronon 8“-Messreihe Stigmachronon 8 durch Medium ersetzt, während bei der „mit Stigmachronon 8“-Messreihe Stigmachronon 8 bei der 30-minütigen JC-1 Färbung vorhanden war. Die Fluoreszenz des JC-1 Farbstoffes wurde zum Nachweis der Schädigung des MMP bei Ex. 485 nm/ Em. 535 nm und zum Nachweis des unbeeinträchtigten MMP bei Ex. 540-580 nm/ Em. 590-570 nm mikroskopisch dokumentiert.

5000 ng/ml auch mit einer 30 min Ruhephase irreversibel depolarisiert, so dass die Zellen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit apoptotisch waren.

Wie bereits erwähnt, besaßen die in dieser Arbeit verwendeten Zellen unterschiedliche Eigenschaften. Deswegen sollte in einem weiteren Versuch mit den primären HUVEC Zellen abgeklärt werden, ob die Wirkung von Stigmachronon 8 auf alle tierischen Zellen reversibel war, oder ob dieser Effekt spezifisch bei der A549 Zelllinie auftrat. Zu diesem Zweck wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet wie beim vorherigen Experiment (Abb. 3.13). Das Versuchsergebnis zeigte, dass das MMP der HUVEC Zellen nach der 30-minütigen Ruhephase nur sehr begrenzt wieder polarisiert wurde. Lediglich das MMP der 100 ng/ml w/o Stigmachronon 8-Probe wies einen reversiblen Effekt auf. Hier lag das MMP der HUVEC Zellen unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 bei 80 %, während das MMP während der 30 min nach Entfernung von Stigmachronon 8 fast vollständig wieder polarisiert wurde, indem nahezu 100 % erreicht wurden. Dagegen ergaben sich für beide Messreihen mit 300 bis 1000 ng/ml Stigmachronon 8 MMP Werte im Bereich zwischen 10 und 30 %. Somit konnten sich die HUVEC Zellen während der 30 min nicht von der Stigmachronon 8-Behandlung erholen. Mit diesem Versuch wurde unerwartet nachgewiesen, dass Stigmachronon 8 das MMP der A549 Zelllinie lediglich reversibel depolarisierte und die Zellen nach Entfernung des Wirkstoffes ihre Vitalität zurückerlangten. Des Weiteren konnte durch die Untersuchung des MMPs der HUVEC Zellen belegt werden, dass dieser reversible Effekt zellspezifisch war, da sich im Gegensatz zu den A549 Zellen die HUVEC Zellen nicht erholten.

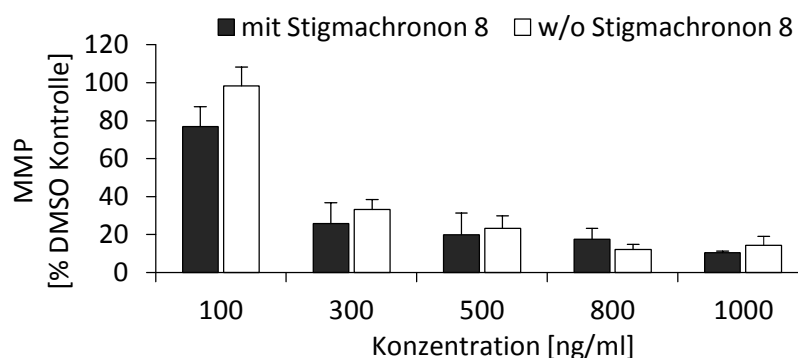


Abb. 3.13: MMP der HUVEC Zellen nach Entfernung von Stigmachronon 8. Nach 24 h Vorinkubation wurde bei der „w/o Stigmachronon 8“-Messreihe Stigmachronon 8 durch Medium ersetzt, während bei der „mit Stigmachronon 8“-Messreihe Stigmachronon 8 bei der 30-minütigen JC-1 Färbung vorhanden war. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, das der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe eingesetzt wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

### 3.2.3 Einfluss der Stigmate auf den tierischen Zellzyklus

#### 3.2.3.1 Die DNA-Syntheserate der A549 Zelllinie wird unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 reduziert

Die Analyse des 5-tägigen MTT Tests deutete einen Einfluss der Stigmate auf die Zellteilung der tierischen Zellen an (Abb.3.4). Deswegen wurde die Zellteilung der A549 Zellen mithilfe des „Cell Proliferation ELISA BrdU“ (Roche) genauer betrachtet. Der Versuch beruht auf dem Nachweis von in die DNA inkorporiertem BrdU während der DNA-Synthese. Die A549 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Stigmachronon 8-Konzentrationen inkubiert, woraufhin für weitere 2 h BrdU zugegeben wurde. Da BrdU ein Analog von Thymidin ist, wurde BrdU anstelle von Thymidin in die DNA mitotischer Zellen eingebaut. Das BrdU wurde anschließend über eine an einen Anti-BrdU Antikörper gekoppelte Peroxidase detektiert.

Das Ergebnis des Versuchs zeigte eine kontinuierliche Abnahme der DNA-Synthese von 200 bis 500 ng/ml Stigmachronon 8 (Abb. 3.14). Ab einer Konzentration von 500 ng/ml betrugen die Signale nur noch ca. 10 bis 20 %. Dies deutete darauf hin, dass die DNA-Syntheserate zwar sehr stark reduziert, die Synthese aber nicht vollständig eingestellt wurde. Dieses Ergebnis unterstützte die Erkenntnis, dass die Depolarisierung des MMPs der A549 Zellen durch eine 24 h Behandlung mit Stigmachronon 8 bis zu einer Konzentration von 2000 ng/ml reversibel war (Abb. 3.11). Mit der Untersuchung der Zellproliferation konnte gezeigt werden, dass die A549 Zellen in Gegenwart von bis zu 800 ng/ml Stigmachronon 8 ausreichend vital waren, um eine geringe Menge DNA zu synthetisieren.

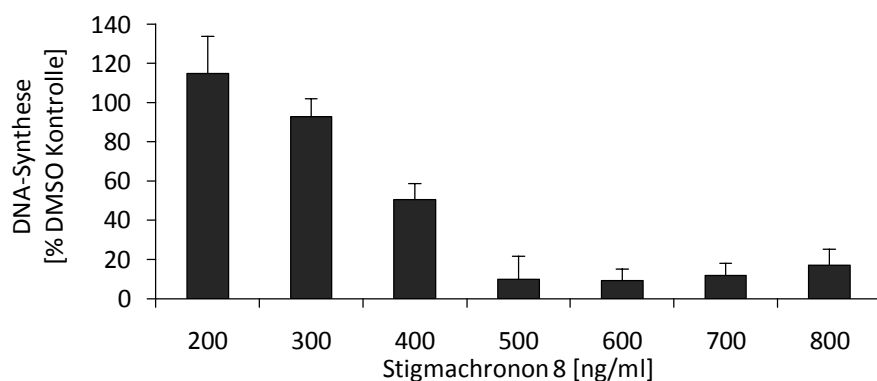


Abb. 3.14: DNA-Synthese der A549 Zelllinie nach Behandlung mit Stigmachronon 8. Die Ansätze wurden mit 3 Replika pro Konzentration angesetzt. Mit einem Kontroll-Ansatz ohne BrdU wurde der Hintergrund bestimmt und von den restlichen Messwerten subtrahiert. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, welches der Menge entsprechend zur höchsten Konzentration der Wirkstoffprobe eingesetzt wurde. Der DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % gesetzt.

### **3.2.3.2 Unter dem Einfluss der Stigmate verlangsamt sich der Ablauf des Zellzyklus der A549 Zelllinie**

In dem vorherigen Experiment wurde der Einfluss von Stigmachronon 8 auf die Zellproliferation der A549 Zelllinie untersucht (Abb. 3.14). Dabei wurde jedoch lediglich die Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus analysiert, indem die über einen bestimmten Zeitraum synthetisierte DNA-Menge quantifiziert wurde. Es wurde festgestellt, dass Stigmachronon 8 die DNA-Synthese weitgehend inhibierte. Jedoch war unklar, ob die Zellen eventuell an einer Stelle des Zellzyklus in einen Arrest eintraten oder der Zellzyklus lediglich verlangsamt wurde. Deshalb wurden für eine spezifischere Untersuchung zwei Methoden eingesetzt, die beide mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert wurden.

Die erste Methode basierte auf der Verwendung des Farbstoffes Propidiumiodid (PI), welcher in die DNA toter Zellen interkaliert. Zellen besitzen in der G<sub>0</sub>- (Gap<sub>0</sub>)- und in der G<sub>1</sub>- (Gap<sub>1</sub>)-Phase einen einfachen DNA-Gehalt, während in der S-Phase die DNA-Menge ansteigt und in der G<sub>2</sub>- (Gap<sub>2</sub>)- sowie der M- (Mitose)-Phase der zweifache DNA-Gehalt vorhanden ist. Entsprechend dem DNA-Gehalt einer Zelle interkaliert eine bestimmte Menge PI, woraufhin auf die Zellzyklusphase, indem sich eine Zelle befindet, geschlossen werden kann.

Für die zweite Methode wurde das „FITC BrdU Flow Kit“ (BD Pharmingen™) eingesetzt, das, wie auch der „Cell Proliferation ELISA BrdU“ Test (Roche), auf dem Nachweis von in die DNA inkorporiertem BrdU beruht. In diesem Fall war jedoch der Anti-BrdU Antikörper mit fluoreszierendem FITC konjugiert, welches mithilfe der FACS Methode nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmarker 7-AAD behandelt, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert.

Bei beiden Methoden wurde zuerst der Zellzyklus der A549 Zellen durch die Zugabe von Hydroxyurea synchronisiert, welches die Synthese von Desoxyribonukleotiden verhinderte (Yarbro, 1992). Aufgrund der fehlenden Desoxyribonukleotide waren die Zellen nicht mehr in der Lage, die S-Phase im Zellzyklus zu beginnen. Somit befanden sich die synchronisierten Zellen direkt am Übergang zwischen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und S-Phase. Die Synchronisierung hatte den Vorteil, dass der Effekt von Wirkstoffen auf die Zellen verstärkt wurde und folglich besser nachgewiesen werden konnte.

Nach der Entfernung des Hydroxyureas wurden 700 ng/ml Stigmareson 7 bzw. 500 ng/ml Stigmareson 8 zu den Zellen gegeben und nach Inkubationszeiten zwischen 1 und 22 h wurden Proben genommen. Die Auswahl der Wirkstoffkonzentrationen richtete sich dabei nach den IC<sub>50</sub>-Werten, die im MTT Test ermittelt worden waren (Tab. 3.2). Die Probenzeitpunkte wurden entsprechend der Phasen des A549 Zellzyklus ausgewählt. Die

Gesamtdauer eines Zyklus betrug hier 18 h  $\pm$  1 h. Das Durchlaufen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase benötigte etwa 7 h, die S-Phase 7,5 h, die G<sub>2</sub>-Phase 2,5 h und die M-Phase (Mitose-Phase) 1 h (Orfanoudakis *et al.*, 1989).

Für die PI Methode wurden die Zellen nach der Ernte mit Ethanol fixiert und permeabilisiert. Die PI-Färbelösung enthielt zusätzlich RNase, um durch den Abbau der RNA zu verhindern, dass in die RNA interkaliertes PI mit erfasst wurde. Für die BrdU/7-AAD Methode wurde 30 min vor jeder Probenahme BrdU zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Saponin permeabilisiert. Die DNA der Zellen wurde mit DNase verdaut, damit das inkorporierte BrdU leichter für den Anti-BrdU-FITC Antikörper zugänglich war. Schließlich wurden die Zellen mit dem Anti-BrdU-FITC Antikörper sowie 7-AAD inkubiert und per FACS gemessen.

Für die Auswertung des Versuchs waren mehrere Kontrollen notwendig (Abb. 3.15). Zunächst wurde mit beiden Methoden der Zellzyklus der asynchronen A549 Zellen betrachtet, die nicht mit Hydroxyurea behandelt worden sind. Das PI Diagramm der asynchronen Zellen zeigte die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Abb. 3.15 A). In der Darstellung wurde die Signalstärke des PI auf der x-Achse gegen die Anzahl der gezählten Zellen auf der y-Achse aufgetragen. Anhand des DNA-Gehalts der Zellen waren die G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase sowie die G<sub>2</sub>- und M-Phase nicht voneinander zu unterscheiden, weshalb eine Aufteilung der Phasen in die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, S-Phase und G<sub>2</sub>/M-Phase vorgenommen wurde. Der höhere linke Peak stellte die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase dar, während der rechte Peak Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase repräsentierte. Der Übergang zwischen beiden Peaks zeigte die Zellen in der S-Phase.

Das FITC-BrdU/ 7-AAD Diagramm der asynchronen Zellen veranschaulichte ebenfalls die Zellverteilung auf die Zellzyklusphasen (Abb. 3.15 B). Hier wurde die Signalstärke der 7-AAD gefärbten Zellen auf der x-Achse gegen die Signalstärke der FITC-BrdU Fluoreszenz auf der y-Achse aufgetragen. Die gezählten Zellen wurden in drei Bereiche unterteilt, die den drei Zellzyklusphasen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>/M entsprachen. Die Zellen in den G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Bereichen wiesen eine geringe FITC Fluoreszenz auf. Dabei handelte es sich um Hintergrund, da die Zellen in diesen Phasen keine DNA synthetisierten und somit kein BrdU eingebaut wurde. Die Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase besaßen eine etwa doppelt so hohe 7-AAD Fluoreszenz wie die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Zellen, da die meisten dieser Zellen kurz vor oder in der Mitose den zweifachen DNA-Gehalt enthielten. Der Bereich der Zellen in der S-Phase befand sich direkt oberhalb der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Bereiche. Die FITC und 7-AAD Fluoreszenz dieser Zellen

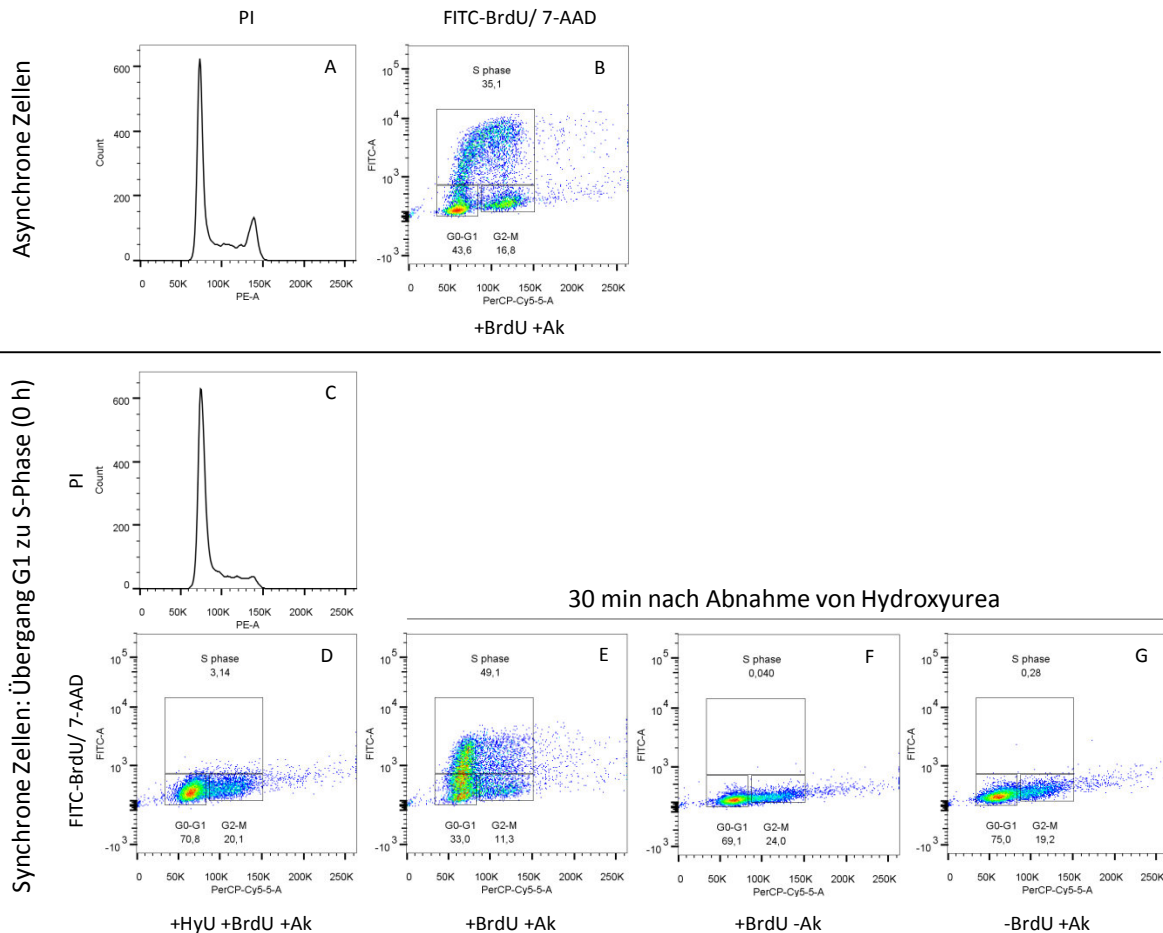


Abb. 3.15: Zellzyklus der A549 Zelllinie. Die DNA der Zellen wurden mithilfe von PI sowie FITC-BrdU/ 7-AAD markiert und anhand von FACS analysiert. Aufgrund der Synchronisierung mit Hydroxyurea (HyU) sowie der Verwendung eines Anti-BrdU-FITC Antikörpers (Ak) wurden mehrere Kontrollen durchgeführt.

nahm gleichzeitig zu, denn je mehr DNA synthetisiert wurde, desto mehr BrdU wurde eingebaut. Somit ergab sich für die asynchronen A549 Zellen eine Aufteilung von ca. 44 % in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, 35 % in der S-Phase sowie 17 % in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Des Weiteren wurden mehrere Kontrollen der mit Hydroxyurea synchronisierten Zellen durchgeführt. Wie bereits erwähnt, sollte sich ein Großteil der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase direkt am Übergang zur S-Phase befinden. Dies konnte sowohl mit dem PI Ansatz als auch dem FITC-BrdU/ 7-AAD Ansatz bestätigt werden (Abb. 3.15 C und D).

Im Vergleich der synchronisierten mit den asynchronen Zellen der PI Proben, fehlte hier der Peak der G<sub>2</sub>/M-Phase (Abb. 3.15 A und C). Jedoch war anscheinend noch eine Minderheit an Zellen vorhanden, die sich in der G<sub>2</sub>/M-Phase befanden und nicht synchronisiert wurden (Abb. 3.15 D). Weiterhin wurde bestätigt, dass aufgrund der Hydroxyurea-Behandlung keine DNA-Synthese erfolgte, da keine Zellen detektiert wurden, die BrdU eingebaut hatten (Abb. 3.15 D). Darüberhinaus hatte sich der Anteil der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase von 44 % auf 71



% und in der G<sub>2</sub>/M-Phase von 17 % auf 20 % erhöht (Abb. 3.15 B und D). Dies bestätigte, dass sich die A549 Zellen aufgrund der Hydroxyurea-Behandlung in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase ankonzentrierten und keine DNA-Synthese stattfand. Es wurde nachgewiesen, dass sich 20 % der Zellen noch in der G<sub>2</sub>/M-Phase befanden. Da ein kompletter Zellzyklus der A549 Zelllinie etwa 18 h dauerte (Orfanoudakis *et al.*, 1989), war die 14 h Inkubationszeit mit Hydroxyurea für eine vollständige Synchronisierung zu kurz, welches aber für das Versuchsziel unerheblich war.

Weiterhin wurden eine Kontrolle zur Wiederaufnahme des Zellzyklus nach Entfernung des Hydroxyureas sowie zwei Kontrollen zur Überprüfung der Funktionalität des BrdU-FITC Antikörpers durchgeführt (Abb. 3.15 E-G). Zunächst konnte ein sofortiges Einsetzen der S-Phase innerhalb der 30 min nach Entfernung des Hydroxyureas belegt werden (Abb. 3.15 E). In der Kontrolle +BrdU/-AK konnte keine FITC Fluoreszenz nachgewiesen werden, was bewies, dass keine unspezifische FITC Fluoreszenz detektiert wurde (Abb. 3.15 F). Ebenfalls konnte keine FITC Fluoreszenz bei der -BrdU/+AK Kontrolle gemessen werden, womit auch eine unspezifische Bindung des Antikörpers ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.15 G).

Für den eigentlichen Versuch wurden die A549 Zellen nach der Entfernung des Hydroxyureas mit 700 ng/ml Stigmareson 7, 500 ng/ml Stigmachronon 8, sowie DMSO und Medium behandelt (Abb. 3.16). Dabei ist anzumerken, dass die zwei Methoden unabhängig voneinander mit Zellen in unterschiedlichen Passagen durchgeführt wurden. Somit waren die Zellzahlen des PI Versuchs und die prozentualen Angaben des FITC-BrdU/ 7-AAD Versuchs nicht in ein direktes Verhältnis zu setzen.

Die erste Probenahme fand nach 1 h Inkubation statt, bei der sich die Zellen in der frühen S-Phase befanden. Die Zellzyklen der PI Ansätze waren im Vergleich miteinander nahezu identisch (Abb. 3.16 A1-4) und wiesen auch keine Veränderung gegenüber der 0 h PI Probe auf (Abb. 3.15 C). Dagegen konnte in den FITC-BrdU/ 7-AAD Proben bereits der Beginn der DNA-Synthese beobachtet werden (Abb. 3.16 B1-4). Etwa 50 % der Zellen in den DMSO- und Medium-Kontrollen befanden sich bereits im S-Phasen Bereich (Abb. 3.16 B1 und B4), welches mit der FITC-BrdU/ 7-AAD Kontrolle 30 min nach Entfernung des Hydroxyurea übereinstimmte (Abb. 3.15 E). Dagegen wurden nur 36 % der Zellen der Stigmareson 7- und Stigmachronon 8-Proben in der S-Phase detektiert (Abb. 3.16 B2 und B3).

Bei dem 4 h Probenzeitpunkt befanden sich die Zellen in der Mitte der S-Phase. Sowohl die Medium- als auch die DMSO-Kontrolle der PI Ansätze wies einen Doppelpeak auf (Abb. 3.16 C1 und C4). Dieser Peak bestand zum einen aus Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und zum anderen aus der synchronisierten Zellpopulation, die in die S-Phase übergegangen war. Dieser

Doppelpeak konnte bei beiden Wirkstoffproben nicht beobachtet werden (Abb. 3.16 C2 und C3). Bei allen FITC-BrdU/ 7-AAD-Ansätzen befanden sich zwischen 50 und 60 % der Zellen in der S-Phase, wodurch sich der in der 1 h Probe beobachtete 15 % Unterschied zwischen den Wirkstoffproben und den Kontrollen minimierte und jetzt nur noch bei ca. 3 % lag (Abb. 3.16 D1-4).

Diese Differenz von Zellen in der Synthese zwischen Stigmat- und Kontroll-Ansätzen vergrößerte sich bei der 7 h Probenahme wieder leicht auf 8 % (Abb. 3.16 F1-4). Zu diesem Zeitpunkt sollte der Übergang von der S-Phase zur G<sub>2</sub>/M-Phase stattfinden. Dies traf auf die Zellen in den FITC-BrdU/ 7-AAD Kontrollen zu, da sich die Anzahl der Zellen in der S-Phase auf etwa 45 % verringerte (Abb. 3.16 F1 und F4). Im Gegensatz dazu waren bei den Stigmat-Ansätzen noch um die 53 % der Zellen in der S-Phase (Abb. 3.16 F2 und F3). Anhand der Kurvenverläufe der PI Proben waren die Unterschiede deutlicher zu erkennen. Die Zellzyklen der Kontrollen waren nahezu identisch, wobei die G<sub>2</sub>/M-Peaks fast die zweifache Höhe der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Peaks erreichten (Abb. 3.16 E1 und E4). Des Weiteren war der genaue Übergang zwischen S-Phase und G<sub>2</sub>/M-Phase nicht mehr bestimmbar. Im Gegensatz dazu befand sich bei den Wirkstoffansätzen die Mehrheit der Zellen noch in der S-Phase (Abb. 3.16 E2 und E3). Die Kurvenverläufe deuteten an, dass anscheinend die DNA-Synthese der Zellen unter dem Einfluss von Stigmareson 7 etwas schneller ablief als die DNA-Synthese der Zellen behandelt mit Stigmachronon 8.

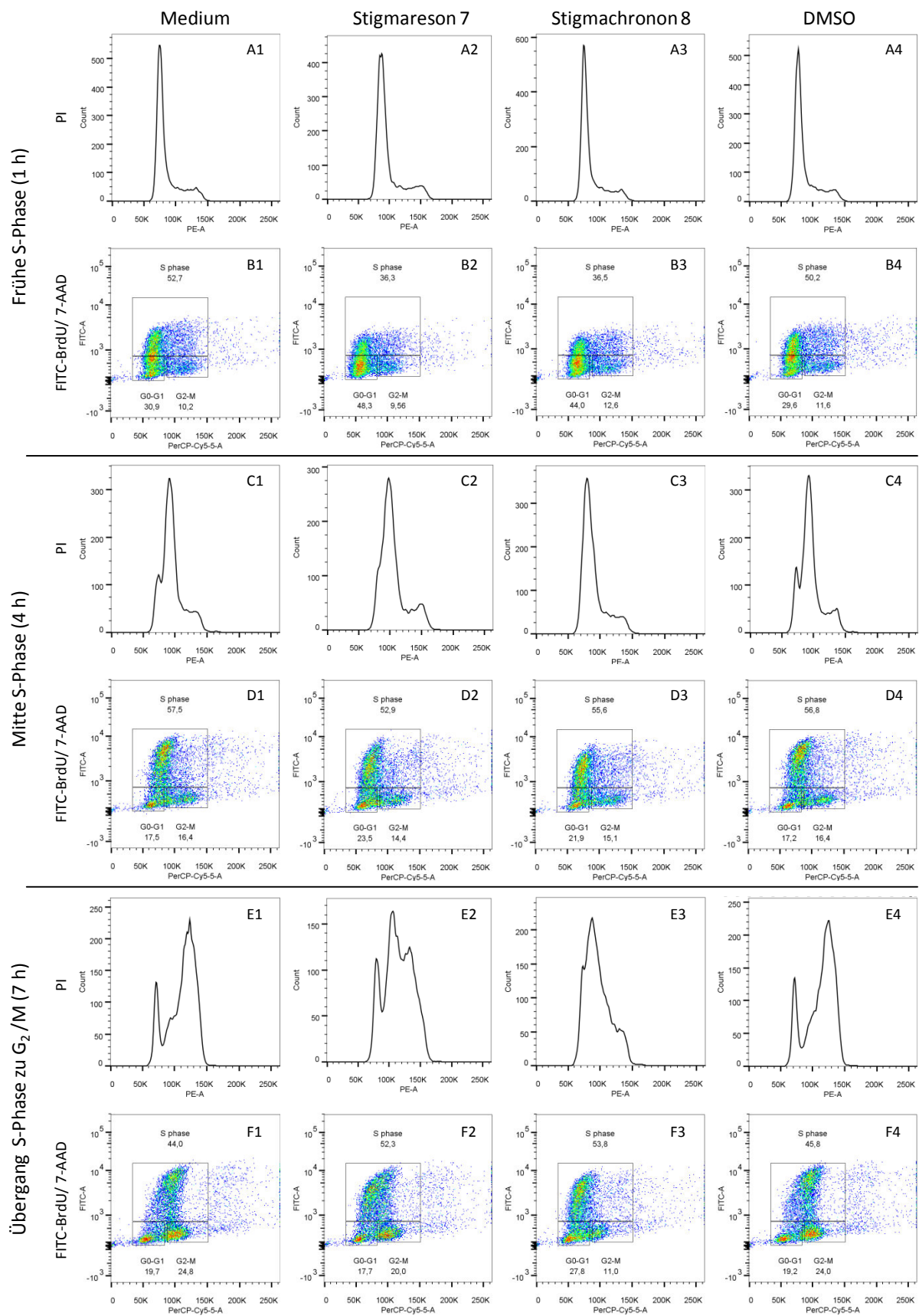
Der 9 h Probenzeitpunkt sollte die Zellen in der späten G<sub>2</sub>/M-Phase darstellen. Dies konnte für die Zellen aus den Kontrollen bestätigt werden. Hier zeigten die PI Ansätze, dass bei den Kontrollen die G<sub>2</sub>/M-Peaks die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Peaks um das 2,3-fache übertrafen (Abb. 3.16 G1 und G4). Dagegen befand sich die Mehrheit der Zellen der Stigmareson 7-Probe im Übergang von der S-Phase zur G<sub>2</sub>/M-Phase (Abb. 3.16 G2), während der Zellzyklus des Stigmachronon 8-Ansatzes von der 7 h Probe zur 9 h Probe nicht fortgeschritten zu sein schien (Abb. 3.16 E3 und G3). Diese Beobachtung wird durch die Daten der FITC-BrdU/ 7-AAD Messung unterstützt. Lediglich 20 % der Zellen in den Kontroll-Ansätzen befand sich in der S-Phase, aber 50 % der Zellen wurden in der G<sub>2</sub>/M-Phase gezählt (Abb. 3.16 H1 und H4). Dagegen verblieben 40 % der Zellen in der Stigmareson 7-Probe und 50 % der Zellen des Stigmachronon 8-Ansatzes immer noch in der S-Phase (Abb. 3.16 H2 und H3).

Weitere 6 h später sollten sich die Zellen wiederum in der Mitte der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase befinden (15 h Probe), welches für die Zellen in den Kontrollen nachgewiesen werden konnte. Dies zeigte sich sowohl im PI als auch im FITC-BrdU/ 7-AAD Ansatz. Zum einen übertraf der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Peak den G<sub>2</sub>/M-Peak um das 9-fache (Abb. 3.16 I1 und I4) und zum anderen wurden über 50

% der Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase zugeordnet (Abb. 3.16 J1 und J4). Der Zellzyklus der Stigmareson 7-Probe hatte sich zu diesem Zeitpunkt dem Zellzyklus der Kontrollen etwas angenähert (Abb. 3.16 I3). Nur noch ein geringer Anteil von 22 % der Zellen befand sich in der G<sub>2</sub>/M-Phase, wohingegen 45 % der Zellen bereits in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase waren (Abb. 3.16 J2). Im Gegensatz dazu wurden bei dem Stigmachronon 8-Ansatz immer noch viele Zellen der S-Phase und der G<sub>2</sub>/M-Phase zugeordnet (Abb. 3.16 I3 und J3).

Die letzte Probe wurde nach 22 h Inkubation genommen, bei der sich die Zellen in der frühen S-Phase befinden sollten. Diese Annahme konnte für die Kontrollen bestätigt werden, indem eine Abnahme der Zellzahl in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase sowie eine Zunahme der Zellzahl in der S-Phase beobachtet wurde (Abb. 3.16 K1/ L1 und K4/ L4). Dies traf nicht auf die beiden Stigmat-Proben zu. Bei dem Stigmareson7-Ansatz wurde die Mehrheit der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase detektiert (Abb. 3.16 K2 und L2), wohingegen die meisten Zellen der Stigmachronon 8-Probe immer noch in der S- und G<sub>2</sub>/M-Phase gezählt wurden (Abb. 3.16 K3 und L3). Jedoch ließ sich, verglichen mit dem 15 h Zeitpunkt, eine leichte Verschiebung von Zellen aus der S-Phase in Richtung G<sub>2</sub>/M-Phase feststellen (Abb. 3.16 I3 und K3).

Die Analyse des Zellzyklus der A549 Zellen unter dem Einfluss von Stigmareson 7 und Stigmachronon 8 ergab eine präzisere Einordnung der Wirkung der Stigmate auf die Zellproliferation. Es konnte bestätigt werden, dass die Stigmate die DNA-Synthese verlangsamen, wie bereits anhand des Ergebnisses des „Cell Proliferation ELISA BrdU“ Experiments vermutet wurde. Bereits der Eintritt der Zellen in die S-Phase wurde aufgrund der Behandlung mit Stigmaten leicht verzögert (Abb. 3.17). Auch bei den späteren untersuchten Zeitpunkten verlief die S-Phase der A549 Zellen behandelt mit Stigmaten im Vergleich zu den Kontrollen verlangsamt, insbesondere beim 9 h Zeitpunkt zeigte sich der größte Unterschied. Das Durchlaufen der anschließenden Zellzyklusphasen fand ebenfalls mit reduzierter Geschwindigkeit statt. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Zellen aufgrund der Wirkung der Stigmate an einer bestimmten Stelle des Zyklus in einen Arrest eintraten. Dieser Effekt war für Stigmachronon 8 bei einer Konzentration von 500 ng/ml ausgeprägter als für Stigmareson 7 bei einer Konzentration von 700 ng/ml.



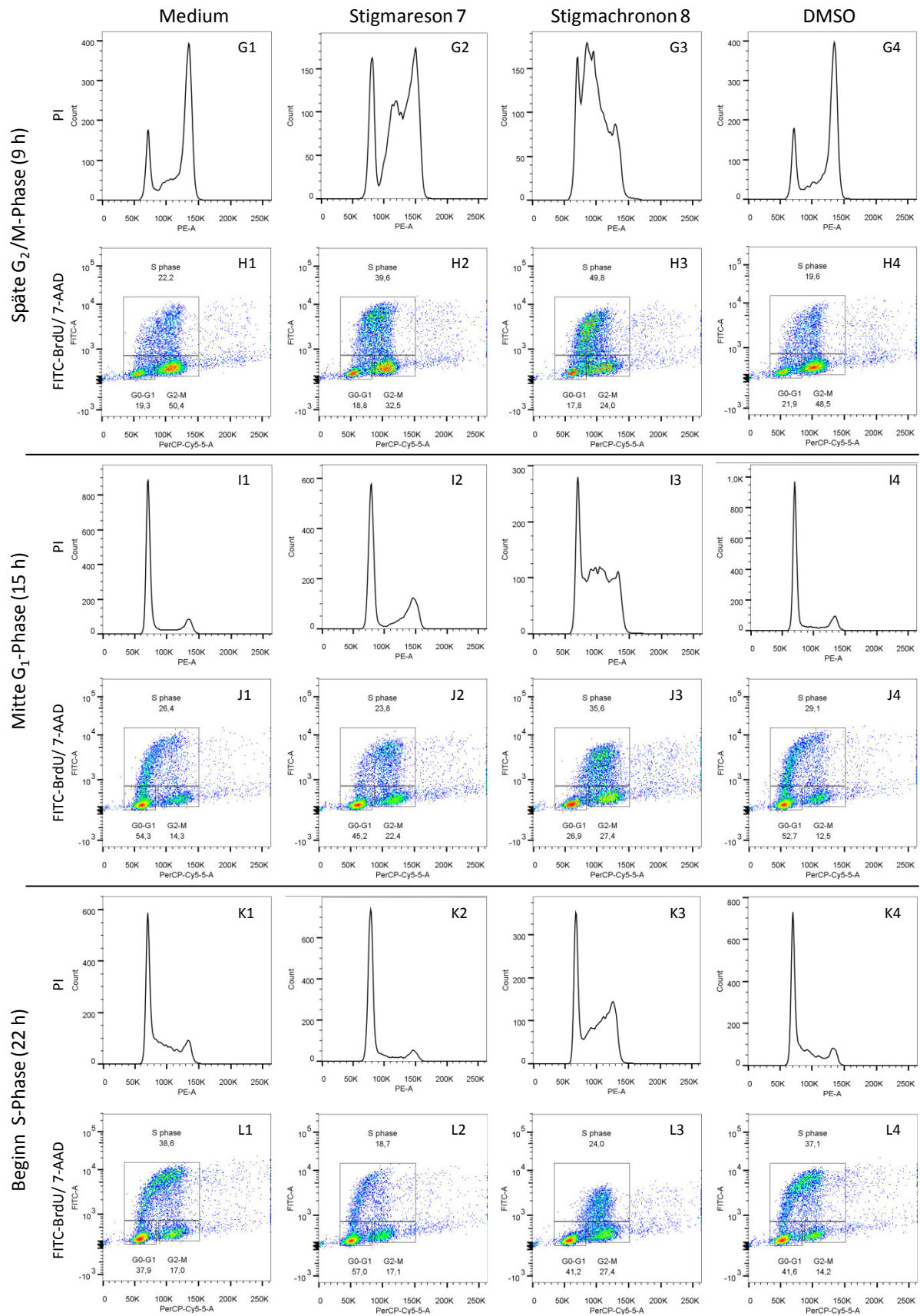


Abb. 3.16: Zellzyklus der A549 Zelllinie unter Einfluss von Stigmareson 7 und Stigmachronon 8. Die DNA der Zellen wurden mithilfe von PI sowie FITC-BrdU/ 7-AAD markiert und der DNA-Gehalt sowie die DNA-Synthese wurden mit der FACS Methode analysiert.

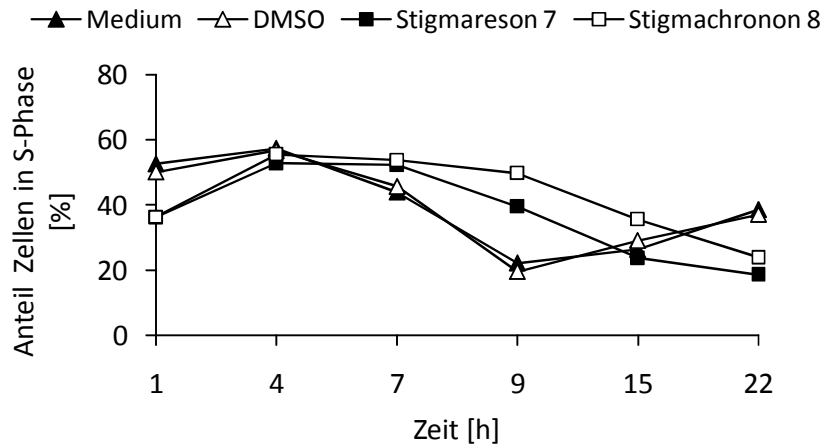


Abb. 3.17: Prozentualer Anteil der Zellen in der S-Phase der A549 Zellzyklusanalyse. Der Anteil an A549 Zellen in der S-Phase aus den FITC-BrdU/ 7-AAD Ansätzen (Abb. 3.16) wurde in Abhängigkeit zur Zeit dargestellt.

### 3.2.3.3 Der Zellzyklus der primären HUVEC Zellen ist unter dem Einfluss der Stigmate nicht beeinträchtigt

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass die Phasendauer im Zellzyklus der A549 Zelllinie unter dem Einfluss der Stigmate erheblich verlängert wurde (Abb. 3.16 und 3.17). Allerdings könnte sich die Wirkung auf den Zellzyklus anderer tierischer Zellen davon wesentlich unterscheiden. Dies war in dieser Arbeit bereits bei der Bestimmung der Zytotoxizität (Abb. 3.4) und der Analyse des MMP (Kap. 3.2.2) beobachtet worden. Beispielsweise zeigte sich bei den primären HUVEC Zellen im MTT Test eine um den Faktor 10 höhere Zytotoxizität als bei den Zelllinien. Aus diesem Grund wurde der Effekt der Stigmate nicht nur auf den Zellzyklus der A549 Zelllinie, sondern zusätzlich auf den Zellzyklus der primären HUVEC Zellen untersucht.

Anders als bei der A549 Zelllinie konnte bei den primären HUVEC Zellen die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen nicht genau festgelegt werden. Diese Zellen sind nicht immortalisiert, weshalb sie sich nur wenige Male teilen können und anschließend in die G<sub>0</sub>-Phase übergehen. Aus diesem Grund ist es auch nur möglich, die HUVEC Zellen über einen Zeitraum von etwa 6 Passagen in Kultur zu halten. Darüberhinaus nimmt während der Kultivierung auch die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen mit jeder Passage ab. Im Vergleich zu der A549 Zelllinie ist die Dauer eines Zellzyklus bei den HUVEC Zellen erheblich länger. Daher wurde zur Synchronisierung der Zellen die Inkubationszeit mit Hydroxyurea auf 24 h ausgeweitet, um den Zellzyklus von möglichst vielen Zellen am Übergang von der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase anzuhalten. Nach der Synchronisierung wurden die HUVEC Zellen mit 200 ng/ml Stigmareson 7 bzw. Stigmachronon 8 über einen Zeitraum

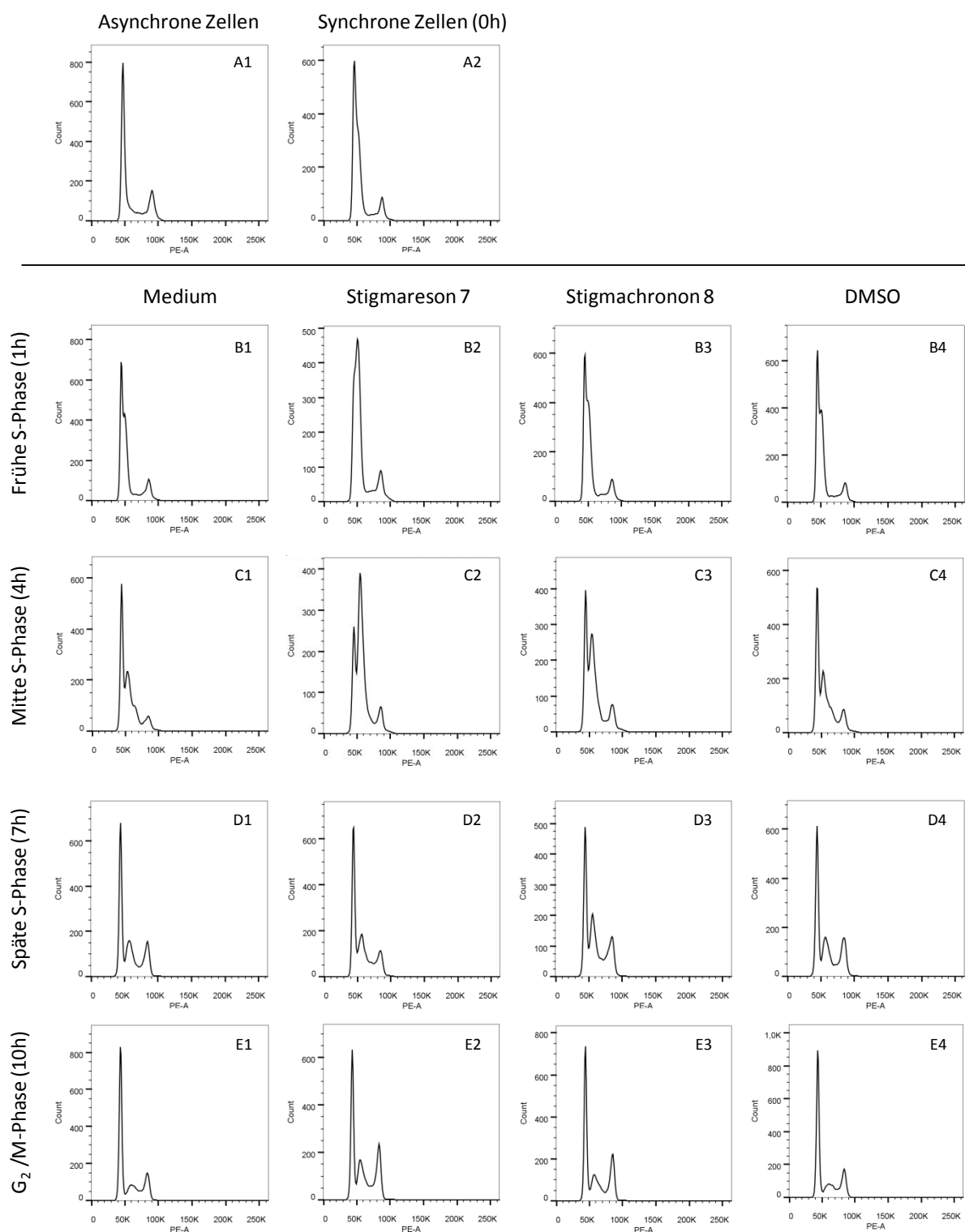
von 1 h bis 31 h behandelt. Dabei richtete sich die ausgewählte Konzentration nach der  $IC_{50}$  des MTT Tests (Abb. 3.4). Wie auch im vorherigen Experiment wurde für die Analyse die DNA der fixierten Zellen mithilfe von PI angefärbt und der DNA-Gehalt mit der FACS Methode quantifiziert.

Zur Überprüfung der Synchronisierung wurde eine Probe mit asynchronen Zellen mit einer Probe synchronisierter Zellen verglichen (Abb. 3.18 A1 und A2). Dabei war der Unterschied zwischen diesen Ansätzen gering, da sich das Verhältnis der  $G_2/M$ -Peakhöhe zur  $G_0/G_1$ -Peakhöhe zwischen den asynchronen und synchronen Zellen nicht wesentlich änderte. Lediglich die Breite des  $G_0/G_1$ -Peaks der synchronen Zellen deutete an, dass sich aufgrund der Synchronisierung mehr Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase befanden als in der asynchronen Probe. Die erste Probenahme erfolgte nach 1 h Inkubation und zeigte die Zellen in der frühen S-Phase. Sowohl bei den Kontrollen mit Medium und DMSO als auch bei den Ansätzen mit Stigmareson 7 und Stigmachronon 8 wurde eine Schulter im  $G_0/G_1$ -Peak beobachtet (Abb. 3.18 B1-4), aus der sich beim 4 h Zeitpunkt bereits ein deutlicher Doppelpeak gebildet hatte (Abb. 3.18 C1-4). Hierbei handelte es sich um die synchronisierte Zellpopulation, die einen geringeren Anteil an der Gesamtzellzahl ausmachte als bei den A549 Zellen (Abb. 3.16 C1 und C4). Während des gesamten Experiments verblieb ein konstanter Anteil an Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase, wobei es sich vermutlich um Zellen in der  $G_0$ -Ruhephase handelte, welche ihre Zellteilung bereits eingestellt hatten.

Sowohl in der S-Phase (1 h, 4 h, 7 h) als auch in der  $G_2/M$ -Phase (10 h) zeigten sich keine Unterschiede im Verlauf des Zellzyklus zwischen den Kontrollen und den Wirkstoffproben, die auf einen Effekt der Stigmate zurückzuführen waren (Abb. 3.18 B1-E4). Bei allen Proben durchlief die synchronisierte Zellpopulation mit der gleichen Geschwindigkeit die Zellzyklusphasen. Auch im direkten Vergleich der Zellen in der S-Phase zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontrollen und Wirkstoffansätzen (Abb. 3.19). Aufgrund der langsameren Proliferation der HUVEC Zellen im Vergleich zu den A549 Zellen sollte auch eine später auftretende Wirkung der Stigmate ausgeschlossen werden. Daher wurden noch weitere Proben bis zu 31 h Behandlungsdauer analysiert (Abb. 3.18 F1-I4). Auch hier zeigte sich kein Effekt der Stigmate, lediglich die synchronisierte Zellpopulation schien wieder aufgelöst zu sein, da die Zellzyklen der 19 h-, 25 h- und 31 h-Proben wieder dem Zellzyklus der asynchronen Zellen ähnelten (Abb. 3.18 G1-I4 und A1).

Aufgrund einer höheren Toxizität der Stigmate auf die primären HUVEC Zellen als auf die A549 Zelllinie im MTT Test, wurde angenommen, dass die Stigmate den HUVEC Zellzyklus wesentlich stärker beeinflussen würden als den A549 Zellzyklus. In Anbetracht der

verlangsamten S-Phase der A549 Zellen, welche durch die Stigmate hervorgerufen wurde, wäre eventuell sogar mit einem Zellzyklusarrest der HUVEC Zellen zu rechnen gewesen. Entgegen dieser Hypothesen konnte jedoch keinerlei Wirkung auf den HUVEC Zellzyklus nachgewiesen werden.





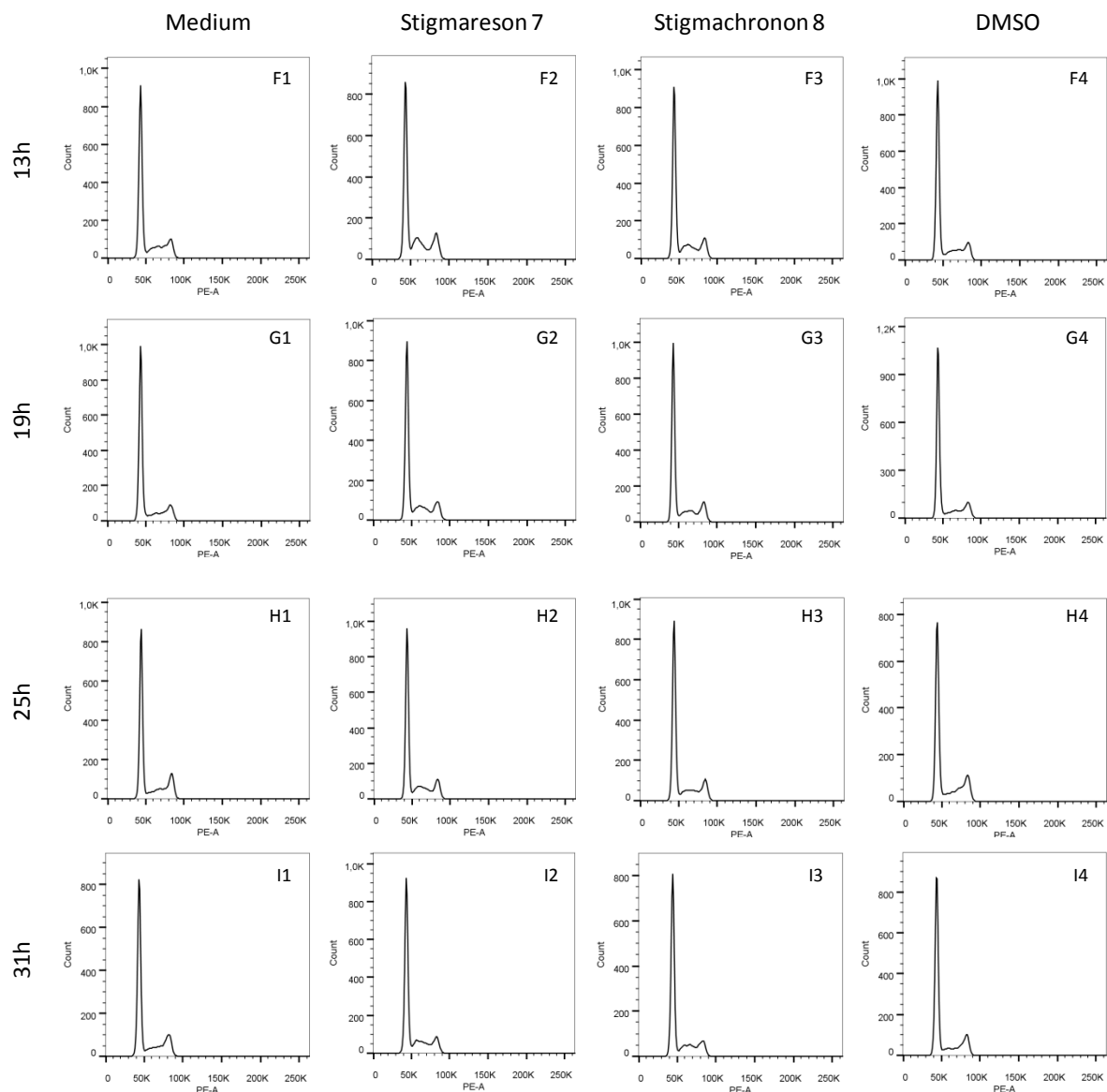


Abb. 3.18: Zellzyklus von HUVEC Zellen unter dem Einfluss von Stigmareson 7 und Stigmachronon 8. Die DNA der Zellen wurden mithilfe von PI markiert und der DNA-Gehalt einzelner Zellen mit der FACS Methode analysiert.

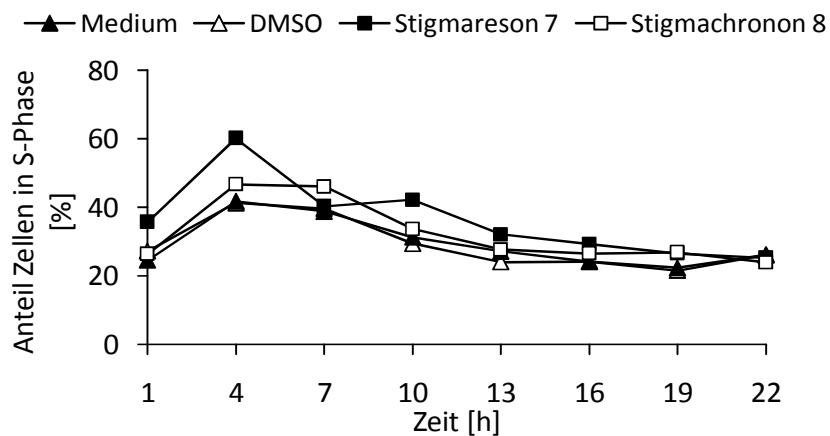


Abb. 3.19: Prozentualer Anteil der Zellen in der S-Phase der HUVEC Zellzyklusanalyse. Der Anteil an HUVEC Zellen in der S-Phase aus den PI Ansätzen (Abb. 3.18) wurde in Abhängigkeit zur Zeit dargestellt.

### 3.2.4 Einfluss der Stigmate auf den Mevalonat Syntheseweg in Säugetierzellen und *Staphylococcus aureus*

Die Analyse des Zellzyklus der A549 Zelllinie ergab eine Verlangsamung der DNA-Synthese, die über den beobachteten Zeitraum von 22 h erhalten blieb. Eine Literatur-Recherche lieferte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der DNA-Synthese und dem Mevalonat Syntheseweg. Bereits 1979 konnte ein Einfluss des Mevalonat Syntheseweges auf den Zellzyklus, insbesondere auf die S-Phase tierischer Zellen, nachgewiesen werden (Quesney-Huneus *et al.*, 1979). Auch gram-positive Kokken, wie *S. aureus*, besitzen den Mevalonat Syntheseweg, den sie vermutlich über horizontalen Gentransfer von einem primitiven eukaryotischen Organismus erworben haben (Wilding *et al.*, 2000a).

Mevalonat ist der Vorläufer der Isoprenoide, die in verschiedene Endprodukte von Säugetierzellen eingebaut werden, wie beispielsweise in Sterole als Komponenten der Zellmembran (z.B. Cholesterin), in Ubiquinone für den Elektronentransport, in Häm a als Bestandteil von Komplex IV der Atmungskette oder zur Farnesylierung von Proteinen als posttranslationale Modifikation (Goldstein und Brown, 1990). Bakterien synthetisieren unter anderem aus den Isoprenoiden anstatt Cholesterin Hopanoide, die der bakteriellen Zellmembran Stabilität verleihen (Kannenberg und Poralla, 1999). Ein weiteres für Bakterien relevantes Mevalonatprodukt ist das aus Farnesyl-Pyrophosphat synthetisierte Undecaprenol Monophosphat, welches bei der Synthese von Peptidoglykan und von Teichonsäure, beides Bestandteile der bakteriellen Zellwand, eine Rolle spielt (Chalker *et al.*, 2000).

Der Mevalonat Syntheseweg beginnt mit zwei Molekülen Acetyl-CoA, aus denen zunächst Acetoacetyl-CoA gebildet wird (Abb. 3.20). Im zweiten Schritt wird aus diesem 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) synthetisiert. Das Enzym HMG-CoA Reduktase reduziert anschließend HMG-CoA zu dem Zwischenprodukt Mevalonat, aus dem über zwei weitere Reaktionen schließlich Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) gebildet wird, welches den Isoprenoid-Grundbaustein darstellt (Liscum *et al.*, 1983; Gibson und Parker, 1987; Dewick, 2002). Das IPP wiederum ist beispielsweise an der Synthese von Cholesterin beteiligt. In Säugetierzellen wird die Aktivität der HMG-CoA Reduktase unter anderem durch eine negative Feedbackschleife reguliert. Bei einem Überschuss an Cholesterin wird die Transkriptionsrate des HMG-CoA Reduktase Gens verringert und gleichzeitig das HMG-CoA Reduktase Protein degradiert (Gil *et al.*, 1985).

Bekannte Medikamente zur Reduzierung eines zu hohen Cholesterinspiegels sind die Statine, welche durch Inhibierung der HMG-CoA Reduktase die Synthese von Mevalonat verhindern, wodurch unter anderem auch die Zellteilung gehemmt wird (Singh *et al.*, 2003; Relja *et al.*,

2010). Daher wurde das Statin Simvastatin eingesetzt, um dessen Wirkung mit der Wirkung der Stigmaten zu vergleichen.

Angenommen, die Stigmaten würden ebenso wie Simvastatin die HMG-CoA Reduktase inhibieren, sollte es möglich sein, dass durch Zugabe von exogenem Mevalonat die Inhibition kompensiert und trotzdem IPP synthetisiert werden könnte. In den folgenden Experimenten wurden *S. aureus* und die Zelllinie A549 mit den Stigmaten bzw. Simvastatin behandelt, wobei in Kombination dazu entweder Mevalonat oder Acetyl-CoA hinzugefügt wurden. Bei der Zugabe von Acetyl-CoA wurde keine Kompensierung erwartet, da Acetyl-CoA gleich im ersten Schritt des Syntheseweges umgesetzt wird.

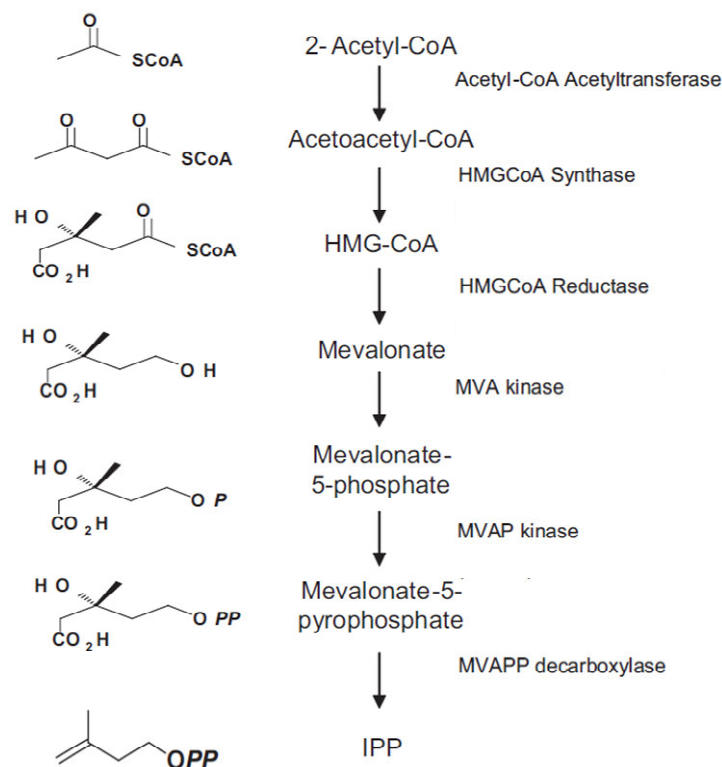


Abb. 3.20: Mevalonat Syntheseweg in Eukaryoten. HmG-CoA: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A; MVA: Mevalonat; MVAP: Mevalonat-5-phosphat; MVAPP: Mevalonat-5-pyrophosphat; IPP: Isopentenyl-Pyrophosphat (aus Ferrand *et al.*, 2011).

### 3.2.4.1 Der pH Wert des Trypton Soja Mediums bleibt nach Zugabe von Stigmaten in Kombination mit Pyruvat oder Mevalonat konstant

Im Gegensatz zu den Zellkulturmedien, welche zur Stabilisierung des pH Wertes einen Puffer bestehend aus Natriumhydrogencarbonat und Dihydrogencarbonat besitzen, enthält das Trypton Soja Bakterienmedium kein klassisches Puffersystem. Stattdessen ist Dikaliumhydrogenphosphat ein Mediumbestandteil, welcher eine pH stabilisierende Wirkung aufweist. Um auszuschließen, dass sich aufgrund der Zugabe von Verbindungen Änderungen im pH Wert ergeben, wurde der pH Wert des Trypton Soja Mediums untersucht. Dazu wurde Stigmareson 7 oder Stigmachronon 8 allein und in Kombination mit drei unterschiedlichen Konzentrationen Pyruvat oder Mevalonat ins Medium gegeben und der pH Wert bestimmt (Abb. 3.21).

Der pH Wert des TSB Mediums lag bei RT etwa bei 7,25, welches den Herstellerangaben entspricht (pH 7,3 +/- 0,2 bei 25 °C). Durch Zugabe von Stigmareson 7 oder Stigmachronon 8 ergab sich eine unwesentliche Erhöhung des pH Wertes auf etwa 7,35. Auch die anschließende Zugabe von verschiedenen Konzentrationen Pyruvat bzw. Mevalonat wirkte sich nicht auf den pH Wert aus. Infolgedessen konnte angenommen werden, dass sich der pH Wert des verwendeten Bakterienmediums aufgrund der Zugabe von diesen Substanzen nicht verändert und eine Auswirkung auf die Versuchsergebnisse konnte ausgeschlossen werden.

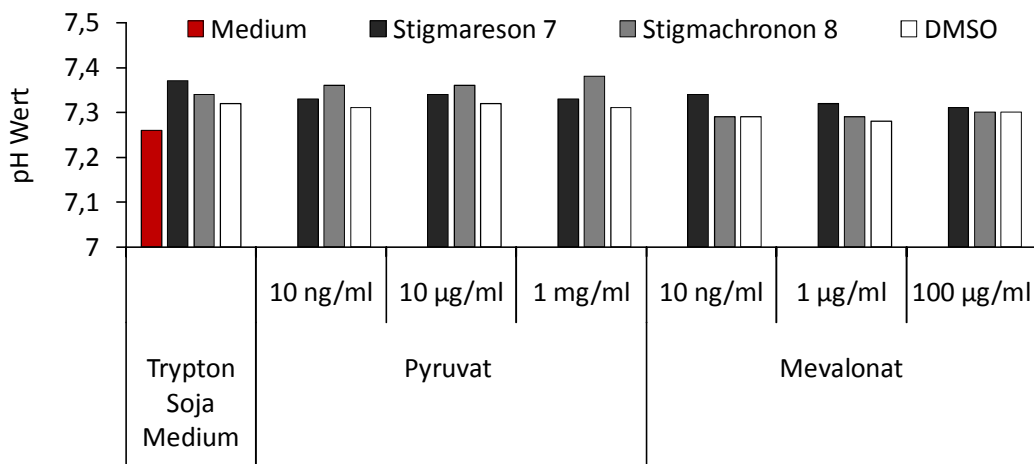


Abb. 3.21: pH Werte von Trypton Soja Medium nach Zugabe von Stigmaten in Kombination mit Pyruvat oder Mevalonat. Es wurden die pH Werte von 100 ng/ml Stigmareson 7 und 100 ng/ml Stigmachronon 8 allein und kombiniert mit drei Konzentrationen Pyruvat bzw. Mevalonat bei RT ermittelt. Das Trypton Soja Medium wurde für alle Experimente mit *S. aureus* verwendet. Als Lösungsmittelkontrolle für die Stigmate diente DMSO, wohingegen auf eine Kontrolle für das in H<sub>2</sub>O gelöste Pyruvat bzw. Mevalonat verzichtet wurde.

### 3.2.4.2 Die wachstumsinhibierende Wirkung der Stigmate auf *Staphylococcus aureus* wird durch Zugabe von Mevalonat bzw. Acetyl-CoA kompensiert

In einer ersten Analyse zur Wirkung der Stigmate auf den Mevalonat Syntheseweg wurde überprüft, ob Simvastatin das bakterielle Wachstum inhibiert und die Zugabe von Mevalonat diese Inhibierung aufhebt. Dafür wurde das klinische MRSA-Isolat mit Simvastatin und Mevalonat allein und in Kombination behandelt und das Wachstum gemessen (Abb. 3.22). Das Ergebnis des Versuchs zeigte, dass sowohl die Bakterien in der Medium-Kontrolle als auch in der Mevalonat-Probe sowie in den verschiedenen Lösungsmittelkontrollen den gleichen Wachstumsverlauf aufwiesen. Somit war auszuschließen, dass Mevalonat oder die Lösungsmittel einen Einfluss auf das Wachstum hatten. Dagegen war ein stark verzögertes Wachstum der Bakterien aufgrund der Zugabe von Simvastatin zu beobachten. Hier begann das Wachstum der Simvastatin & H<sub>2</sub>O-Probe erst nach 8 h Inkubation. Die Simvastatin & Mevalonat-Probe dagegen zeigte bereits nach 5,5 h einen Anstieg der OD<sub>600</sub>. Auffällig war bei allen Simvastatin-Ansätzen, dass die log-Phase eine höhere OD<sub>600</sub> von 1,3 erreichte, bevor der Übergang in die stationäre Phase stattfand. Im Gegensatz dazu erreichten die Bakterien in allen übrigen Ansätzen eine maximale OD<sub>600</sub> von 1,1.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Inhibierung durch Simvastatin durch die Zugabe von Acetyl-CoA nicht beeinflusst wird. Dazu wurde das klinische MRSA-Isolat ebenfalls mit

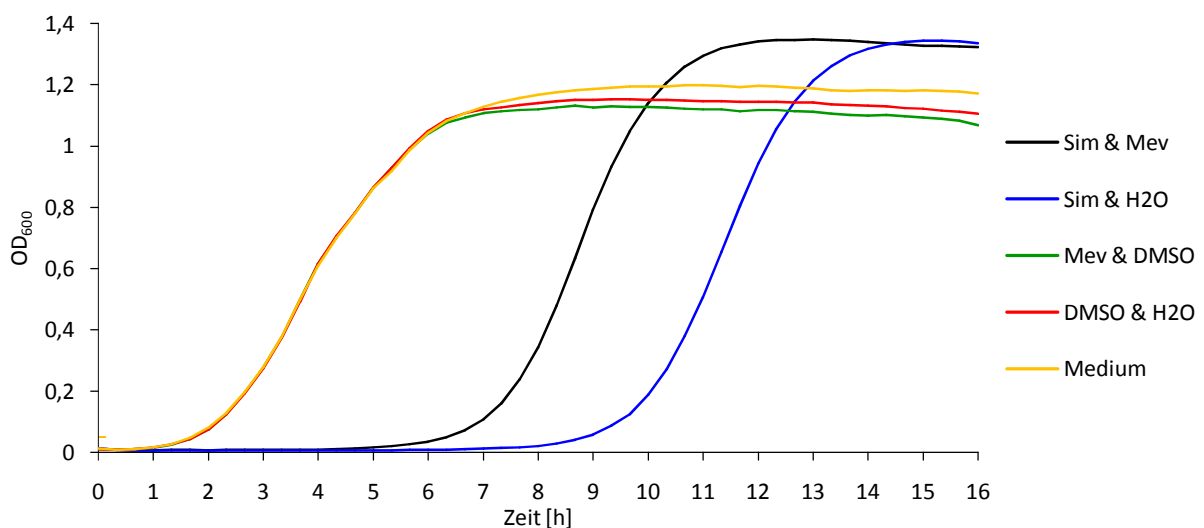


Abb. 3.22: Wachstum des klinischen MRSA-Isolates unter dem Einfluss von Simvastatin (Sim) in Kombination mit Mevalonat (Mev). Sowohl die beiden Substanzen als auch die entsprechenden Lösungsmittel wurden in allen Kombinationsmöglichkeiten getestet. Simvastatin wurde in einer Konzentration von 40 µg/ml und Mevalonat in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. In den Kontrollen wurde die gleiche Menge an Lösungsmittel (H<sub>2</sub>O für Mevalonat; DMSO für Simvastatin) verwendet, die auch in den Wirkstoffansätzen vorlag. Alle Ansätze wurden in vier Replika durchgeführt.

Simvastatin sowie Acetyl-CoA allein und in Kombination behandelt und das Wachstum gemessen (Abb. 3.23).

Hier ergab die Zugabe von Acetyl-CoA allein keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum, da die Acetyl-CoA Probe den gleichen Wachstumsverlauf wie die übrigen Kontrollen zeigte. Die Zugabe von Simvastatin allein sowie in Kombination mit Acetyl-CoA rief dagegen ein verzögertes Wachstum hervor, wobei der Wachstumsbeginn der Simvastatin & Acetyl-CoA Probe 1 h später eintrat als bei der Simvastatin Probe. Somit konnte gezeigt werden, dass Simvastatin das bakterielle Wachstum hemmte. Weiterhin wurde durch die Zugabe von Mevalonat die Simvastatin-vermittelte Inhibierung des Mevalonat Syntheseweges kompensiert, welches sich in einem früheren Wachstum äußerte. Dagegen fand diese Kompensierung durch das Hinzufügen von Acetyl-CoA wie erwartet nicht statt. Daher erschien dieser Versuchsaufbau dazu geeignet, ebenfalls die Wirkung der Stigmate auf den bakteriellen Mevalonat Syntheseweg zu untersuchen.

Zunächst wurden Stigmachronon 8 und Stigmareson 19 in Kombination mit Mevalonat verwendet, um das Wachstum des klinischen MRSA-Isolates zu analysieren (Abb. 3.24). Bei beiden Ansätzen mit den Stigmaten lag ein verzögertes Wachstum vor, welches durch Zugabe von Mevalonat wieder rekonstituiert werden konnte. Während das Wachstum

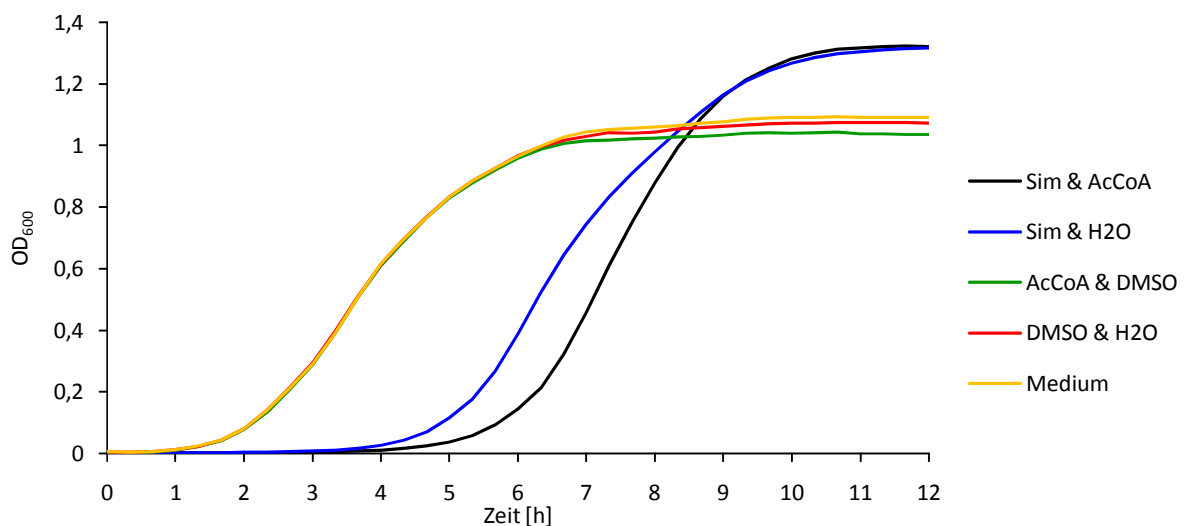


Abb. 3.23: Wachstum des klinischen MRSA-Isolates unter dem Einfluss von Simvastatin (Sim) in Kombination mit Acetyl-CoA (AcCoA). Sowohl die beiden Substanzen als auch die entsprechenden Lösungsmittel wurden in allen Kombinationsmöglichkeiten getestet. Simvastatin wurde in einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  und Acetyl-CoA in einer Konzentration von 1  $\text{ng/ml}$  eingesetzt. In den Kontrollen wurde die gleiche Menge an Lösungsmittel ( $\text{H}_2\text{O}$  für Acetyl-CoA; DMSO für Simvastatin) verwendet, die auch in den Wirkstoffansätzen vorlag. Alle Ansätze wurden in vier Replika durchgeführt.

der Stigmachronon 8 & Mevalonat-Kultur dem Wachstumsverlauf der Kontrollen entsprach, wies die Stigmareson 19 & Mevalonat-Kultur ein unwesentlich langsames Wachstum als die Kontrollen auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Stigmate einen Einfluss auf den Mevalonat Syntheseweg hatten, welcher durch die Zugabe von Mevalonat kompensiert wurde. Wäre die HMG-CoA Reduktase das Target der Stigmate, könnte diese Inhibierung durch die Zugabe eines Metaboliten, welcher im Syntheseweg vor der Bildung von Mevalonat zum Einsatz kommt, nicht kompensiert werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Wachstum des klinischen MRSA-Isolates mit einer Kombination aus Stigmaten und Acetyl-CoA untersucht (Abb. 3.25). Da Acetyl-CoA das Ausgangsprodukt des Mevalonat Syntheseweges darstellt, sollte dessen Zugabe keinen Einfluss auf die

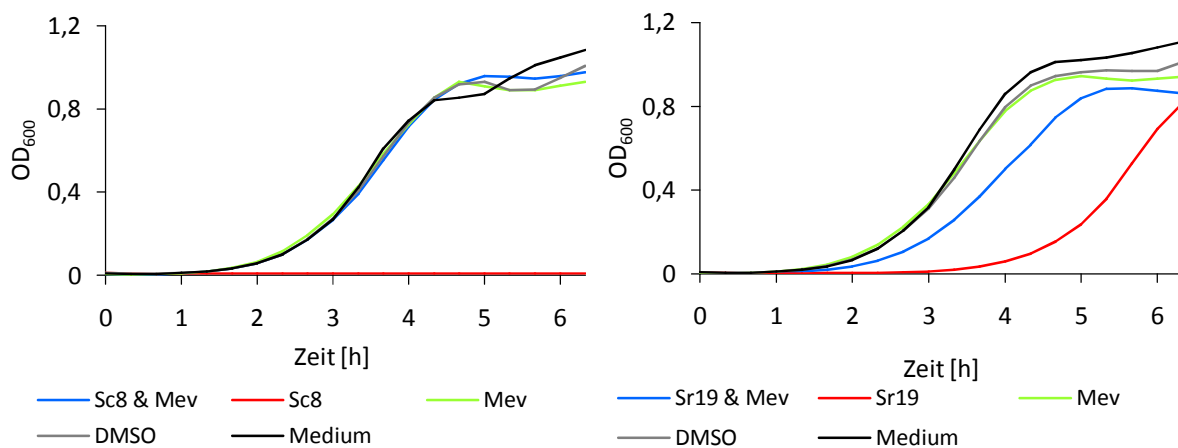


Abb. 3.24: Wachstum des klinischen MRSA-Isolates unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 (Sc8; links) und Stigmareson 19 (Sr19; rechts) in Kombination mit Mevalonat (Mev). Sc8 wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml, Sr19 in einer Konzentration von 90 ng/ml und Mev in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. In den Kontrollen wurde die gleiche Menge an DMSO verwendet, die auch in den Wirkstoffansätzen vorlag. Alle Ansätze wurden in vier Replika durchgeführt.

wachstumshemmende Wirkung der Stigmate haben. Jedoch zeigte sich entgegen der Erwartung, dass auch die Zugabe von Acetyl-CoA eine Aufhebung der Wachstumshemmung des klinischen MRSA-Isolates hervorrief. Für den Stigmachronon 8 & Acetyl-CoA-Ansatz war eine vollständige Rekonstitution des Wachstums zu beobachten, während der Stigmareson 19 & Acetyl-CoA-Ansatz wiederum eine partielle Kompensierung der Wachstumshemmung aufwies. Damit war unwahrscheinlich, dass es sich bei der HMG-CoA Reduktase um das Target der Stigmate handeln könnte und stellt darüberhinaus in Frage, ob die Stigmate überhaupt direkt den Mevalonat Syntheseweg beeinflussen.

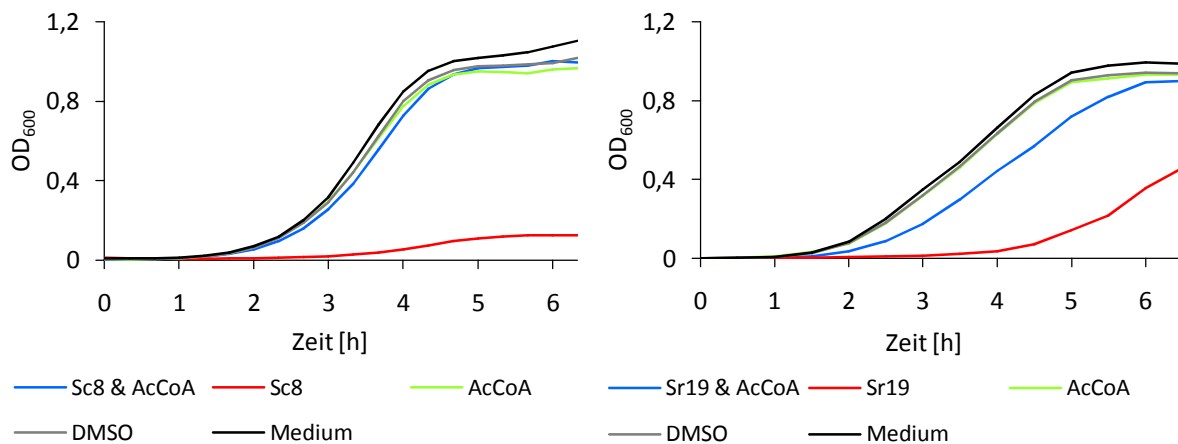


Abb. 3.25: Wachstum des klinischen MRSA-Isolates unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 (Sc8; links) und Stigmareson 19 (Sr19; rechts) in Kombination mit Acetyl-CoA (AcCoA). Sc8 wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml, Sr19 in einer Konzentration von 90 ng/ml und AcCoA in einer Konzentration von 1 ng/ml eingesetzt. In den Kontrollen wurde die gleiche Menge an DMSO verwendet, die auch in den Wirkstoffansätzen vorlag. Alle Ansätze wurden in vier Replika durchgeführt.

### 3.2.4.3 Die Stigmate beeinflussen nicht den Glukoseverbrauch und die Acetatsynthese von *Staphylococcus aureus*

Im vorherigen Kapitel konnte die Hypothese, dass die Stigmate einen direkten Einfluss auf die bakterielle Mevalonat Synthese besaßen, nicht bestätigt werden. Dabei wurde die wachstumsinhibierende Wirkung der Stigmate auf die Bakterien sowohl durch Zugabe von Mevalonat als auch Acetyl-CoA kompensiert. Das für die Synthese von Mevalonat benötigte Acetyl-CoA wird unter anderem in der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat gebildet, welches wiederum das Endprodukt der Glykolyse darstellt. Daher wurde zusätzlich der Effekt der Stigmate auf das bakterielle Wachstum unter der Zugabe von Pyruvat analysiert, um die Verfügbarkeit von endogenem Acetyl-CoA zu überprüfen (Abb. 3.26). Sollte die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA inhibiert werden, würde die Zugabe von exogenem Pyruvat die Wachstumsreduktion ebenfalls nicht kompensieren. Dieser Versuch ergab wiederum eine Kompensierung des wachstumsinhibierenden Effekts der Stigmate. Infolgedessen bestand die Möglichkeit, dass die Stigmate einen Zwischenschritt der Glykolyse inhibieren. Im Idealfall würde sich aufgrund der Inhibierung einer Synthesereaktion das zuletzt gebildete Zwischenprodukt im Medium anreichern, indem es von den Bakterien ausgeschleust werden würde.

Daher wurde *S. aureus* NCTC 8325 mit Stigmachronon 8 über 7 h im Trypton Soja Medium inkubiert (Abb. 3.27) und es wurden stündlich Proben genommen, deren Überstand mithilfe einer HPLC auf Zwischenprodukte der Glykolyse analysiert wurde (mit Unterstützung von



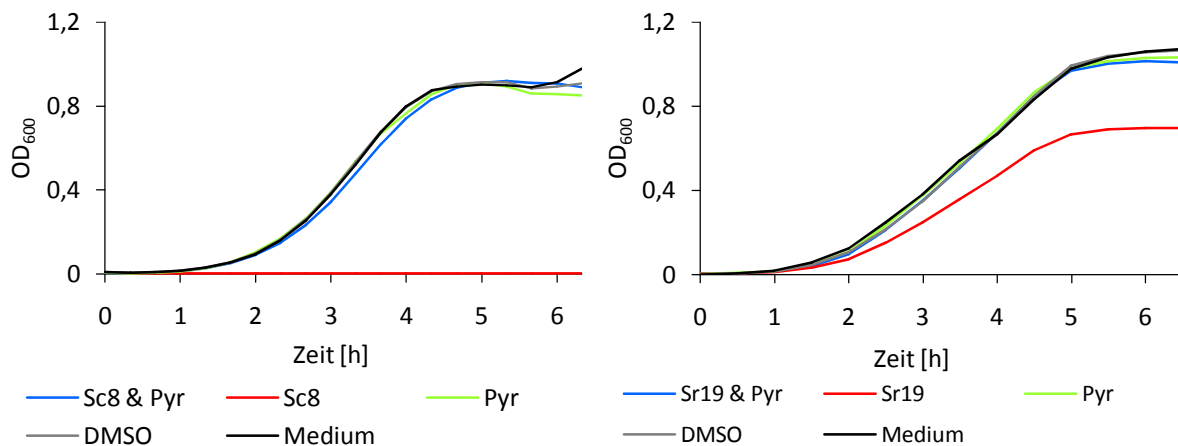


Abb. 3.26: Wachstum des klinischen MRSA-Isolates unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 (Sc8; links) und Stigmareson 19 (Sr19; rechts) in Kombination mit Pyruvat (Pyr). Sc8 wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml, Sr19 in einer Konzentration von 90 ng/ml und Pyruvat in einer Konzentration von 1 ng/ml eingesetzt. In den Kontrollen wurde die gleiche Menge an DMSO verwendet, die auch in den Wirkstoffansätzen vorlag. Alle Ansätze wurden in vier Replika durchgeführt.

Steffen Bernecker, AG MWIS, HZI). Es wurde eine verhältnismäßig geringe Konzentration von 60 ng/ml Stigmachronon 8 ausgewählt, damit die Bakterien lediglich in ihrer Vitalität eingeschränkt waren und nicht zu stark geschädigt oder abgetötet wurden. In der Analyse der organischen Säuren wurden zunächst als Metabolite der Glykolyse Glukose-6-phosphat, Fruktose-6-phosphat, Fruktose-1,6-biphosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Phosphoglycerinsäure, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat sowie Acetat als Standards mithilfe der HPLC vermessen. Zusätzlich wurden Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinat und Fumarat als Standards analysiert, die Zwischenprodukte des Citratzyklus darstellen. Auch die Einzelbestandteile des komplexen Trypton Soja Mediums Kasein Pepton, Soja Pepton, Natriumchlorid, Dikaliumhydrogenphosphat und Glukose wurden sowohl einzeln als auch im Gemisch vermessen. Die HPLC Analyse sollte für einen Standard ein spezifisches Chromatogramm ergeben, wodurch eine eindeutige Zuordnung von diesem Standard in dem Stoffgemisch der zu analysierenden Probe möglich sein sollte. Daher mussten sich die Chromatogramme dieser Standards voneinander unterscheiden, welches jedoch nur bei Glukose, Fumarat, Malat, Pyruvat und Acetat der Fall war. Die übrigen Standards waren nicht eindeutig zuzuordnen. Des Weiteren wurden in der HPLC Analyse der Stigmachronon 8- und DMSO-Proben lediglich Glukose, Acetat und vermutlich Pyruvat und Fumarat in detektierbaren Mengen nachgewiesen. Dabei konnten Fumarat und Pyruvat nicht eindeutig identifiziert werden, da sich aufgrund des Soja Peptons und des Kasein Peptons im Medium vielfach ineinander übergehende Peaks ergaben. Daher konnten lediglich die

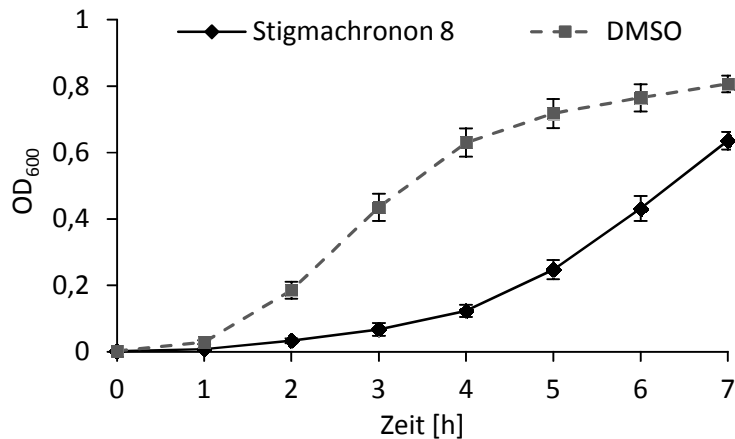


Abb.3.27: Wachstum von *S. aureus* NCTC 8325 unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 zur Analyse der Überstände auf Zwischenprodukte der Glykolyse und des Citratzyklus. Die Bakterien wurden mit 60 ng/ml Stigmachronon 8 sowie der entsprechenden Menge an DMSO als Kontrolle in einer Mikrotiterplatte behandelt. Zur stündlichen Probenahme wurden die OD<sub>600</sub> bestimmt.

Messdaten von Glukose und Acetat ausgewertet werden (Abb. 3.28). Die Kohlenstoff-Quelle des Trypton Soja Mediums ist Glukose, deren Abnahme im Medium über die Zeit mit dem Wachstum der Bakterien korrelierte (Abb. 3.27 und 3.28). Nach 7 h Inkubation war im DMSO-Ansatz die Glukose vollständig aufgebraucht und die Bakterien gingen bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 in die stationäre Phase über. Durch die Zugabe von Stigmachronon 8 waren das bakterielle Wachstum und der Glukose-Verbrauch im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt. Die Bakterien fingen erst nach 4 h an zu wachsen und nach 7 h wurden noch ca. 0,2 mg/ml Glukose im Medium detektiert.

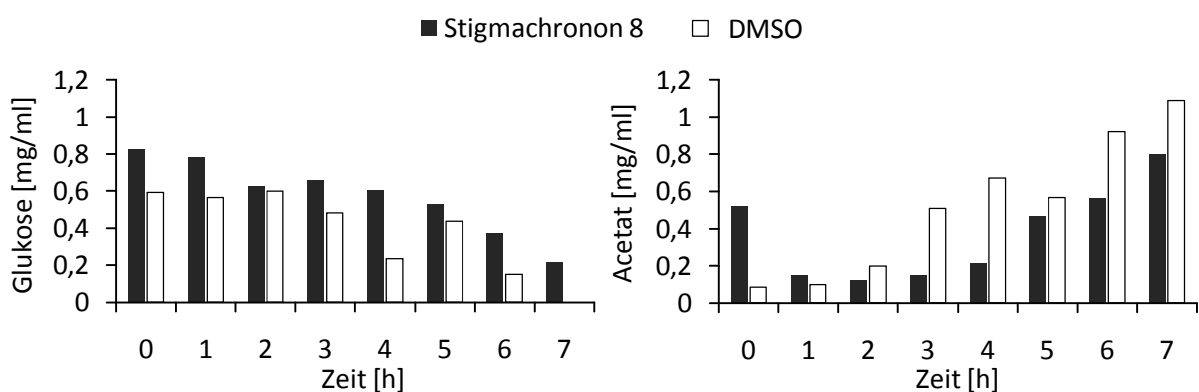


Abb. 3.28: Gehalt von Glukose und Acetat im Überstand von *S. aureus* NCTC 8325 unter dem Einfluss von Stigmachronon 8. Die Bakterien wurden mit 60 ng/ml Stigmachronon 8 sowie der entsprechenden Menge an DMSO als Kontrolle über 7 h in einer Mikrotiterplatte behandelt (Abb. 3.25). Die Überstände wurden in einer HPLC-Analyse auf Metabolite der Glykolyse sowie des Citratzyklus untersucht.

Die Anreicherung von Acetat im Medium dient *S. aureus* als Energiereserve (Somerville *et al.*, 2003). Unter aeroben Bedingungen entsteht während der exponentiellen Phase aus dem in der Glykolyse gebildeten Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung Acetyl-CoA (Gardner und Lascelles, 1962). Aus Acetyl-CoA kann unter anderem Acetat synthetisiert werden, welches von *S. aureus* ins Medium sekretiert wird. Während des Experiments nahm die Acetat-Menge im Überstand mit der Zeit zu, wobei der Acetat-Gehalt der Kontrolle schneller anstieg als in der Stigmachronon 8-Probe. Dennoch war der Kurvenverlauf von beiden Messreihen identisch. Daher scheint Stigmachronon 8 lediglich eine Verzögerung der Acetatsynthese von *S. aureus* hervorgerufen zu haben.

Da jede Probe nur einmal per HPLC vermessen wurde, repräsentierte jeder Balken im Diagramm nur einen Messwert. Dies erklärte die teilweise starken Schwankungen zwischen den Proben. Beispielsweise ist es nicht möglich, dass die Glukose-Menge in der DMSO-Probe von 0,2 mg/ml (4 h) wieder auf 0,4 mg/ml (5 h) ansteigt. Des Weiteren sollte sowohl die Glukose-Menge als auch die Acetat-Menge bei der 0 h-Probe im Stigmachronon 8-Ansatz und im DMSO-Ansatz identisch sein. Diese Abweichungen beruhen auf Messfehlern und könnten durch Wiederholungen der HPLC-Messungen minimiert werden.

Die HPLC-Analyse lieferte keine konkreten Ergebnisse bezüglich einer Wirkung von Stigmachronon 8 auf die Zwischenprodukte der bakteriellen Glykolyse oder den Citratzyklus, da die meisten der untersuchten Metabolite nicht mit der HPLC Methode in einem Stoffgemisch bzw. in einem komplexen Medium identifiziert werden konnten. Dafür wurde gezeigt, dass Stigmachronon 8 Verzögerungen im Glukoseverbrauch und in der Anreicherung von Acetat im Medium hervorrief. Aufgrund der funktionsfähigen Synthese von Acetat konnte indirekt darauf geschlossen werden, dass die Stigmate keine Inhibierung der Glykolyse bewirken, da Acetat aus Pyruvat gebildet werden konnte, welches das Endprodukt der Glykolyse darstellt. Diese Annahme wurde durch den Verbrauch der Glukose unterstützt. Darüber hinaus sind vermutlich das verlangsamte Wachstum und der wahrscheinlich vom Wachstum abhängige verzögerte Glukoseverbrauch eine Konsequenz der unbekannten Wirkung von Stigmachronon 8 auf *S. aureus*.

#### **3.2.4.4 Die Wirkung der Stigmate auf das mitochondriale Membranpotential der A549 Zelllinie wird durch Zugabe von Mevalonat nicht kompensiert**

Zur Analyse einer Kompensierung des möglicherweise durch die Stigmate inhibierten Mevalonat Syntheseweges wurde das mitochondriale Membranpotential der A549 Zelllinie

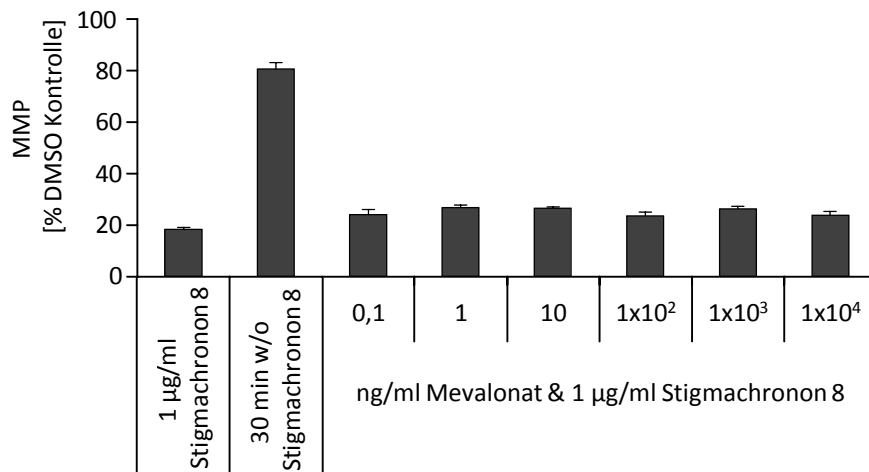


Abb. 3.29: MMP der A549 Zelllinie unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 in Kombination mit Mevalonat. Nach 24 h Vorinkubation wurde beim „w/o Stigmachronon 8“-Ansatz Stigmachronon 8 durch Medium ersetzt, während bei allen übrigen Ansätze die Wirkstoffe bei der 30 minütigen JC-1 Färbung vorhanden waren. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, das der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe verwendet wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

betrachtet. Zur Beantwortung der Fragestellung wurde dieser Versuchstyp ausgewählt, da eine Re-Polarisierung des MMPs der A549 Zelllinie nach Entfernung der Stigmate beobachtet wurde (Abb. 3.11). Dieser reversible Effekt wäre möglicherweise ebenfalls nachzuweisen, wenn anstatt die Stigmate zu entfernen Mevalonat zu den Zellen gegeben wurde. Daher wurde Mevalonat in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis  $1 \times 10^4$  ng/ml in Kombination mit 1 µg/ml Stigmachronon 8 für 24 h auf die Zellen gegeben (Abb. 3.29). Als Kontrollen dienten zwei Ansätze mit Stigmachronon 8, wobei bei einem Ansatz das Stigmachronon 8 30 min vor der Fluoreszenzmessung von den Zellen entfernt wurde. Die Kontrollen zeigten den reversiblen Effekt auf das MMP der A549 Zellen nach Entfernung von Stigmachronon 8. Ebenso wie die Stigmachronon 8-Kontrolle, wiesen alle Zellen unter dem Einfluss der verschiedenen Mevalonat-Konzentrationen kombiniert mit Stigmachronon 8 ein MMP von 20 % auf. Folglich war keine Re-Polarisierung des MMP aufgrund der Zugabe von Mevalonat nachgewiesen worden.

Um auszuschließen, dass die verwendeten Mevalonat-Konzentrationen eventuell zu gering gewählt wurden, wurde in einem weiteren Experiment der Konzentrationsbereich auf 0,5 bis  $1 \times 10^6$  ng/ml Mevalonat erhöht (Abb. 3.30). In diesem Versuch wurde anstelle von Stigmachronon 8 Stigmareson 7 mit einer Konzentration von 800 ng/ml verwendet. Das Ergebnis von diesem Experiment zeigte das gleiche Resultat wie der vorherige Versuch. Die Kontrollen bewiesen, dass die Wirkung von Stigmareson 7 auf die A549 Zelllinie reversibel

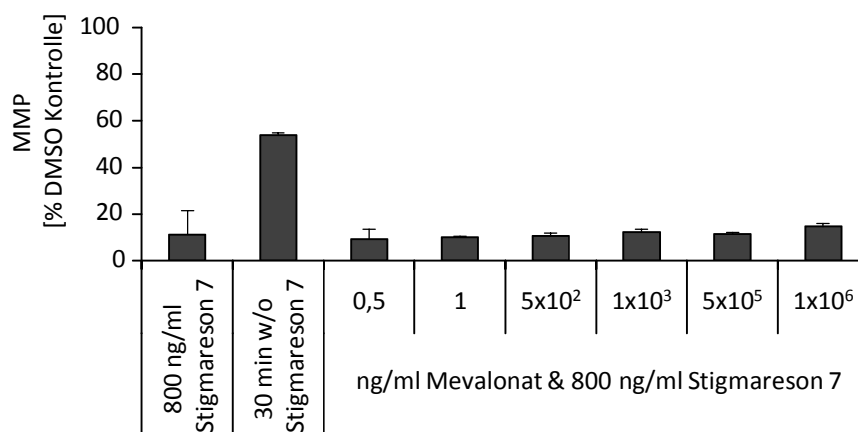


Abb. 3.30: MMP der A549 Zelllinie unter dem Einfluss von Stigmareson 7 in Kombination mit Mevalonat. Nach 24 h Vorinkubation wurde beim „w/o Stigmareson 7“-Ansatz Stigmareson 7 durch Medium ersetzt, während bei allen übrigen Ansätze die Wirkstoffe bei der 30 minütigen JC-1 Färbung vorhanden waren. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, das der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe eingesetzt wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

war. Dennoch konnte keine Re-Polarisierung des MMPs aufgrund der Zugabe von Mevalonat nachgewiesen werden, unabhängig von den eingesetzten Mevalonat Konzentrationen. Obwohl anscheinend die Wirkung der Stigmate auf die A549 Zelllinie durch die Zugabe von Mevalonat nicht kompensiert wurde, wurde dennoch das MMP der A549 Zellen unter dem Einfluss von Simvastatin analysiert, um einen Vergleich zwischen der Wirkung der Stigmate und Simvastatin ziehen zu können.

Im Vorfeld wurde die Zytotoxizität von Simvastatin auf die Zellen mithilfe eines MTT Tests analysiert (Abb. 3.31). In dem Konzentrationsbereich von 0,05 bis etwa 1,6  $\mu\text{g/ml}$  Simvastatin nahm die Zellvitalität nur geringfügig ab und lag dann zwischen 1,6 und 12  $\mu\text{g/ml}$  bei ca. 80 %. Dagegen war die Wirkung auf die Zellteilung stärker, hier war ein kontinuierlicher Abfall bis nahezu 0 % in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 3  $\mu\text{g/ml}$  zu beobachten. In einem ersten Experiment zum MMP wurde eine Konzentration von 400 ng/ml Simvastatin verwendet, da diese Konzentration im MTT Test dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert bezogen auf die Zellteilung entsprach (Abb. 3.31). Allerdings zeigte das Versuchsergebnis mit 400 ng/ml Simvastatin keine aussagekräftigen Unterschiede des MMPs zwischen den Simvastatin-Kontrollen und den Mevalonat und Simvastatin-Ansätzen (Abb. 3.32). Bei allen Ansätzen lag das MMP bei Werten zwischen 70 und 100 %. Zusätzlich konnte kein reversibler Effekt zwischen den Kontrollen Simvastatin und 30 min w/o Simvastatin beobachtet werden. Da bei beiden Kontrollen das MMP bei 80 % war, wurde vermutet, dass die eingesetzte Simvastatin

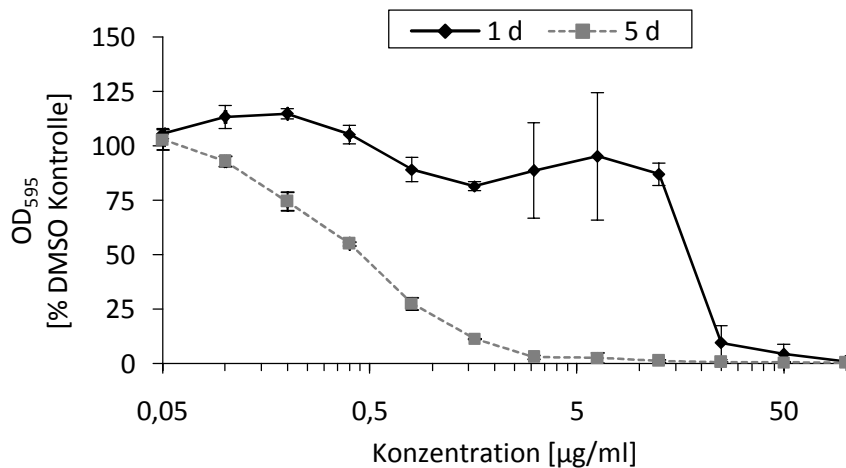


Abb. 3.31: Zytotoxizität von Simvastatin auf die A549 Zelllinie. Im MTT Test wurden die A549 Zellen über 1 Tag (Zellvitalität) und 5 Tage (Zellteilung) mit Simvastatin behandelt. Die Standardabweichung wurde aus drei Replika ermittelt und es wurde eine Normierung mithilfe der Messwerte der DMSO-Kontrolle vorgenommen.

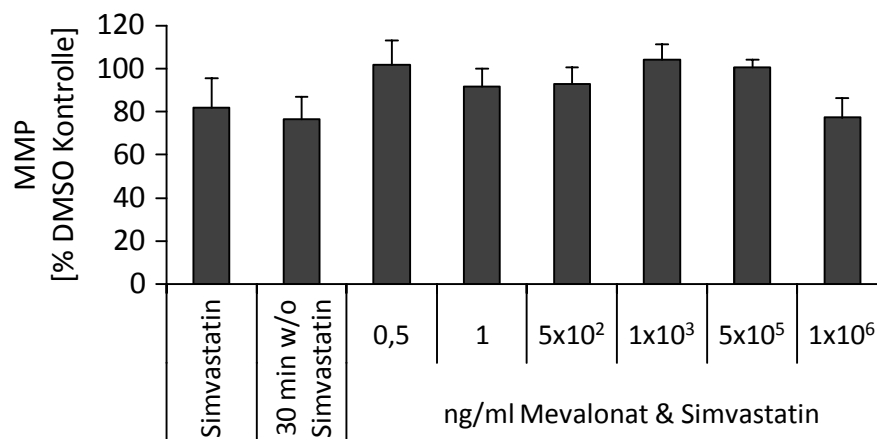


Abb. 3.32: MMP der A549 Zelllinie unter dem Einfluss von 400 ng/ml Simvastatin in Kombination mit Mevalonat. Nach 24 h Vorinkubation wurde beim „w/o Simvastatin“-Ansatz Simvastatin durch Medium ersetzt, während bei allen übrigen Ansätze die Wirkstoffe bei der 30 minütigen JC-1 Färbung vorhanden waren. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, das der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe eingesetzt wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt

Konzentration zu niedrig war. Daher wurde der Versuch mit Konzentrationen von 800 ng/ml und 1200 ng/ml Simvastatin wiederholt (Abb. 3.33). Bei beiden Simvastatin Konzentrationen wurde das MMP auf 20 % depolarisiert. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Simvastatin-Konzentrationen von 800 und 1200 ng/ml und darüber hinaus schien der Effekt von Simvastatin auf die A549 Zellen nicht reversibel zu sein. Der irreversible Effekt von Simvastatin im Vergleich zur reversiblen Wirkung der Stigmate auf das MMP der A549 Zellen lässt vermuten, dass die Stigmate wahrscheinlich nicht den gleichen Wirkmechanismus wie Simvastatin haben. Jedoch kann keine Aussage getroffen werden, ob die HMG-CoA Reduktase das Target der Stigmate ist. Darüberhinaus war die Analyse des MMPs

möglicherweise nicht das geeignete Versuchsmodell, um eine kompensierende Wirkung von Mevalonat auf die mit Simvastatin bzw. Stigmaten behandelten Zellen analysieren zu können. Möglicherweise kompensiert Mevalonat die Simvastatin-vermittelte Inhibierung der HMG-CoA Reduktase, jedoch scheint Simvastatin weitere Wirkungen zu haben, die anhand des MMPs nachgewiesen worden sind und die nicht durch Zugabe von Mevalonat kompensiert wurden. Somit könnte mit diesem Versuchsaufbau nicht die primäre Wirkung von Simvastatin, sondern die durch Sekundäreffekte hervorgerufene Schädigung des MMPs nachgewiesen worden sein.

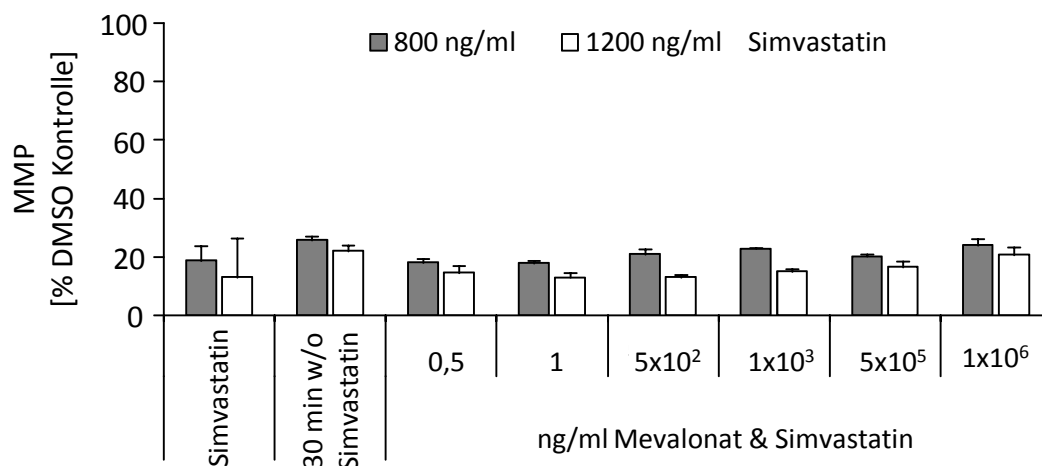


Abb. 3.33: MMP der A549 Zelllinie unter dem Einfluss von 800 und 1200 ng/ml Simvastatin in Kombination mit Mevalonat. Nach 24 h Vorinkubation wurde beim „w/o Simvastatin“-Ansatz Simvastatin durch Medium ersetzt, während bei allen übrigen Ansätze die Wirkstoffe bei der 30 minütigen JC-1 Färbung vorhanden waren. Der Versuch wurde pro Konzentration mit 3 Replika angesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, das der Menge entsprechend zur Wirkstoffprobe eingesetzt wurde. Der jeweilige DMSO-Messwert wurde in der Analyse als 100 % MMP gesetzt.

### 3.2.5 Einfluss der Stigmate auf die tierische AMP-aktivierte Proteinkinase

Sowohl für *S. aureus* als auch für die A549 Zelllinie konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Stigmate einen direkten Einfluss auf den Mevalonat Syntheseweg bzw. auf die bakterielle Glykolyse besitzen. Daher bestand die Möglichkeit, dass die Wirkung der Stigmate bereits vor der Synthese von Mevalonat einsetzt.

Ein wichtiger Regulator vieler Stoffwechselprozesse ist die AMP (Adenosinmonophosphat)-aktivierte Proteinkinase (AMPK) (Curtis *et al.*, 1973; Carling *et al.*, 1987). Die AMPK ist eine Serin/Threonin Proteinkinase und fungiert als metabolischer Sensor in eukaryotischen Zellen (Abb. 3.34; Curtis *et al.*, 1973; Carling *et al.*, 1987; Hardie *et al.*, 1998). Jede Säugetierzelle besitzt ein AMPK System, welches abhängig vom ATP-Gehalt eine Vielzahl

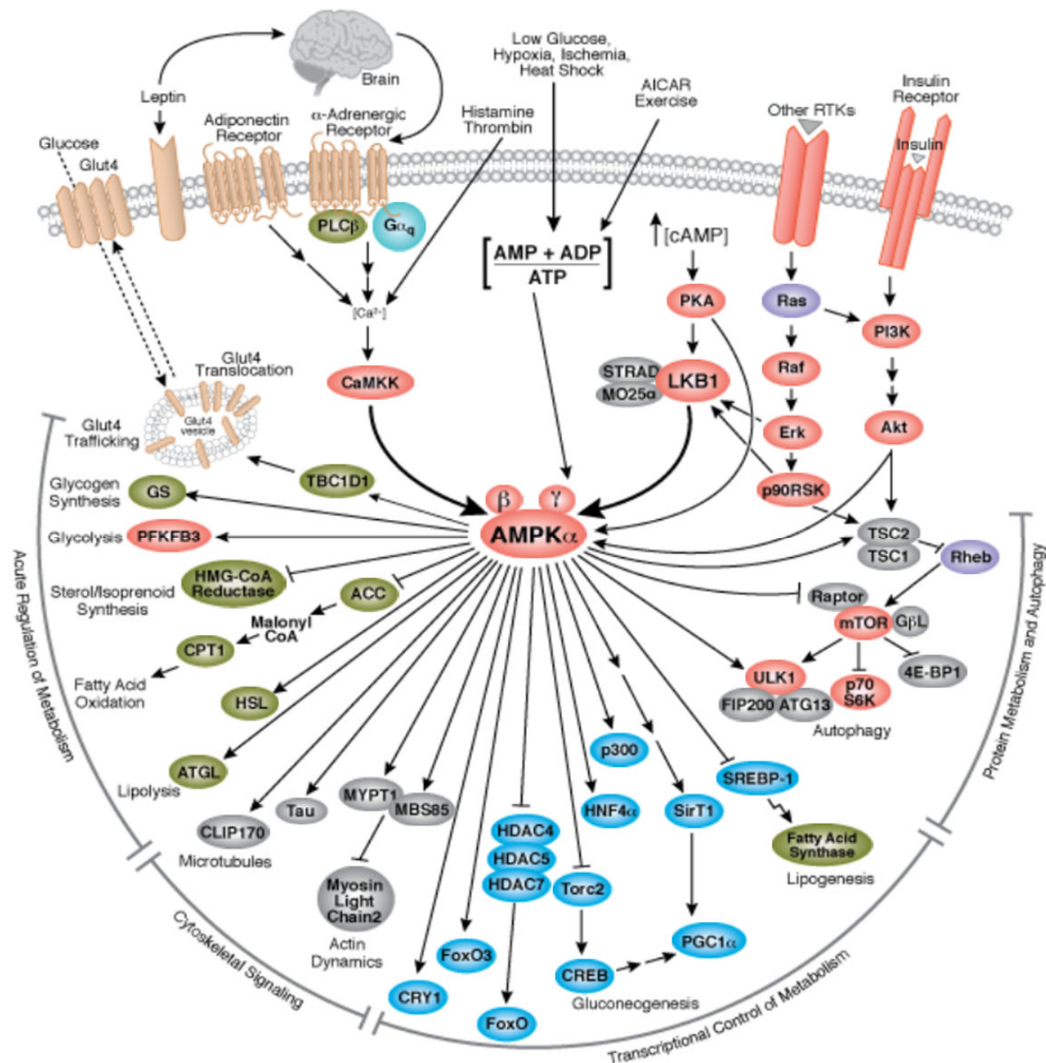


Abb. 3.34: AMPK Signalweg in Säugetieren (Quelle: [www.cellsignal.com/reference/pathway/AMPK.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/AMPK.html); Stand November 2012).

metabolischer Prozesse reguliert und dadurch die negativen Auswirkungen von ernährungs- oder umweltbedingten Stress verringert (Hardie und Carling, 1997). Stress wird beispielsweise durch Glukosemangel, Sauerstoffmangel oder auch Hitzeschock ausgelöst (Kemp *et al.*, 2003). Die aktivierte AMPK phosphoryliert und inhibiert metabolisch relevante Enzyme, die an ATP-verbrauchenden Prozessen beteiligt sind, wie z.B. der Fettsäure-, Protein- und Cholesterinsynthese (Carlson und Kim, 1973; Beg *et al.*, 1973; Sato *et al.*, 1993). Des Weiteren aktiviert die AMPK ATP-bereitstellende Prozesse, wie die Glykolyse und die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren (Hayashi *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1995). Darüberhinaus kann die AMPK auch einen Arrest des Zellzyklus induzieren (Igata *et al.*, 2005).

Die AMPK ist ein heterotrimeres Protein, welches aus einer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit und jeweils einer regulatorischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit besteht (Davies *et al.*, 1994). Neben einer Threonin 172-Phosphorylierungsstelle in der  $\alpha$ -Untereinheit besitzt die AMPK zwei weitere Bindungsstellen (Bateman Domänen) in der  $\gamma$ -Untereinheit, an welche die regulatorischen



Nukleotide AMP oder Mg-ATP kompetitiv binden können (Davies *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 2004). Im physiologischen Zustand liegt die AMPK überwiegend inaktiviert in einem Komplex mit Mg-ATP vor. Ist dagegen in der Zelle mehr AMP als ATP vorhanden, wird statistisch häufiger AMP gebunden. Durch die Bindung an AMP erfolgt vermutlich eine Konformationsänderung, wodurch die Kinase für die Phosphorylierung zugänglich wird (Xiao *et al.*, 2007). Die AMPK kann z.B. von den zwei Upstream-Kinasen Leberkinase B1 (LKB1) oder Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase-Kinase (CaMKK $\beta$ ) durch Phosphorylierung des Threonin 172 aktiviert werden (Woods *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2005).

### 3.2.5.1 Zytotoxizität von Metformin und Compound C auf die A549 Zelllinie

Zur Analyse einer direkten Wirkung der Stigmate auf den Phosphorylierungszustand der AMPK wurden zwei Kontrollen eingesetzt. Dabei handelte es sich um Metformin als Positivkontrolle und Compound C als Negativkontrolle. Der Wirkmechanismus von Metformin konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden; wahrscheinlich ist die Aktivierung der AMPK durch Metformin ein indirekter Effekt (Liu *et al.*, 2011b). Compound C ist ein Inhibitor und wirkt direkt auf die AMPK, indem es bei Abwesenheit von AMP mit ATP um die Bindungsstellen an der AMPK konkurriert (Zhou *et al.*, 2001). Zur Bestimmung, in welcher Konzentration die Kontrollen verwendet werden sollten, wurde zunächst mit einem MTT Test die Zytotoxizität auf die A549 Zellen bestimmt (Abb. 3.35). Metformin zeigte eine

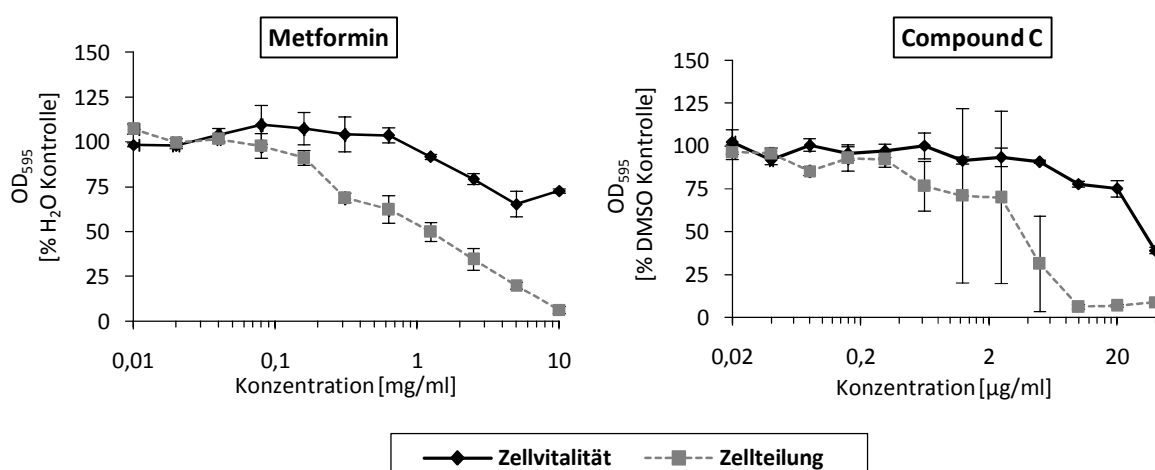


Abb. 3.35: Zytotoxizität von Metformin und Compound C auf die A549 Zelllinie. Im MTT Test wurden die A549 Zellen über 1 Tag (Zellvitalität) und 5 Tage (Zellteilung) behandelt. Die Standardabweichung wurde aus drei Replika ermittelt und es wurde eine Normierung mithilfe der Messwerte der DMSO-Kontrolle vorgenommen.

Wirkung auf die Zellvitalität ab einer Konzentration von 1 mg/ml, wohingegen Compound C ab einer Konzentration von 10 µg/ml toxisch wirkte. Des Weiteren lag die IC<sub>50</sub> bezogen auf die Zellteilung für Metformin bei 1 mg/ml und für Compound C bei 3 µg/ml.

### **3.2.5.2 Die Lokalisierung von Cholesterin in der A549 Zelllinie wird durch die Stigmate nicht beeinflusst**

Durch eine Aktivierung der AMPK wird der Mevalonat Syntheseweg gehemmt und demzufolge sollte auch weniger Cholesterin gebildet werden. Im Gegensatz dazu kann bei einer Hemmung der AMPK der Mevalonat Syntheseweg ungehindert ablaufen und Cholesterin kann (über)produziert werden. Möglicherweise bewirken die Stigmate durch eine Aktivierung der AMPK eine verminderte Produktion von Mevalonat und Cholesterin, welches sich in einem verlangsamten Zellwachstum äußert. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde zunächst die Wirkung der Stigmate als auch der Kontrollen auf den Cholesteringehalt der A549 Zelllinie untersucht, um so indirekt auf die Aktivität der AMPK zu schliessen (Abb. 3.36). Hierfür wurde das Cholesterin angefärbt, welches ein wichtiger Bestandteil der tierischen Zellmembran ist. Dies wurde mithilfe des Fluoreszenzmarkers Filipin III durchgeführt, der spezifisch an Cholesterin bindet. Für den Versuch wurden pro Wirkstoff drei Konzentrationen verwendet, wobei die mittlere Konzentration der IC<sub>50</sub> für die A549 Zellen entsprach. Die Aufsichtsmikroskopaufnahmen zeigten, dass alle Zellen Cholesterin synthetisierten. Das Cholesterin war in den Zellen der DMSO- und H<sub>2</sub>O-Kontrollen sowohl in der äußeren Zellmembran als auch in der Membran des Zellkerns lokalisiert. Des Weiteren waren in verschiedenen Proben kleine runde Strukturen im Zytoplasma zu erkennen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Lamellarkörper handelt. Die Lamellarkörper sind charakteristisch für die zu den Typ II alveolaren Epithelzellen zählenden A549 Zellen. Sie bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden und Cholesterinestern und werden in die Lunge sekretiert, wo sie als oberflächenaktiver Stoff (Surfactant) zur Reduzierung der Oberflächenspannung dienen (Lieber *et al.*, 1976; Foster *et al.*, 1998).

Im Vergleich der Wirkstoffproben mit den Kontrollen wiesen lediglich die mit Compound C behandelten Zellen eine Veränderung auf. So schienen Stigmareson 7, Stigmachronon 8 und Metformin visuell keinen Effekt auf die Lokalisierung von Cholesterin zu haben. Im Gegensatz dazu verursachte Compound C eine veränderte Verteilung des Cholesterins in der Zelle. Vermutlich war der Transport des Cholesterins zur Zellmembran defekt, da das meiste Cholesterin im Zytoplasma, eventuell im endoplasmatischen Retikulum, und nicht in der

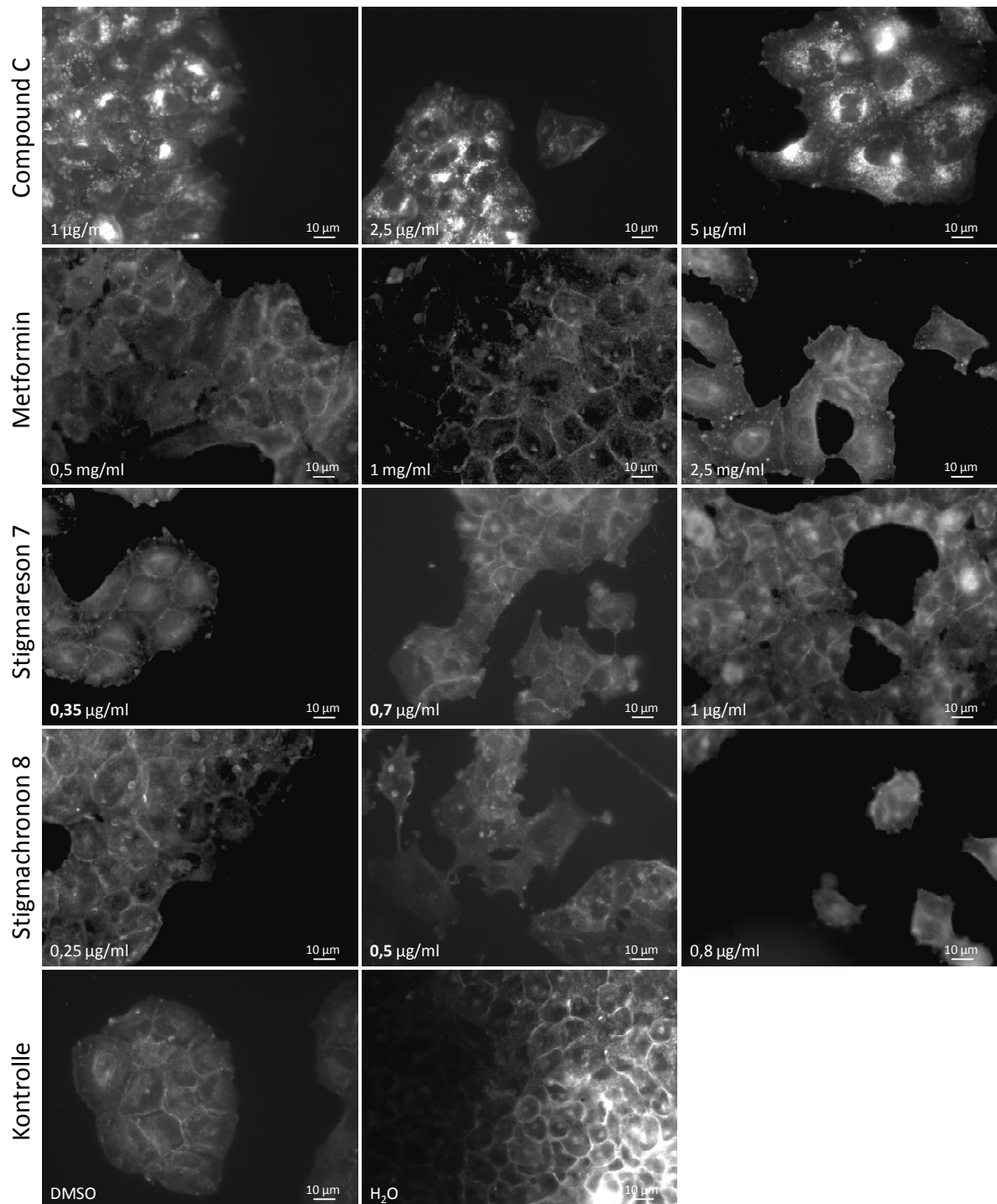


Abb. 3.36: Cholesterin in der A549 Zelllinie unter dem Einfluss der Stigmate und Regulatoren der AMPK. Die Zellen wurden über 48 h mit Stigmareson 7, Stigmachronon8, Metformin und Compound C behandelt. Nach Fixierung wurde das Cholesterin der Zellen mit Filipin III angefärbt und Mikroskopaufnahmen wurden angefertigt.

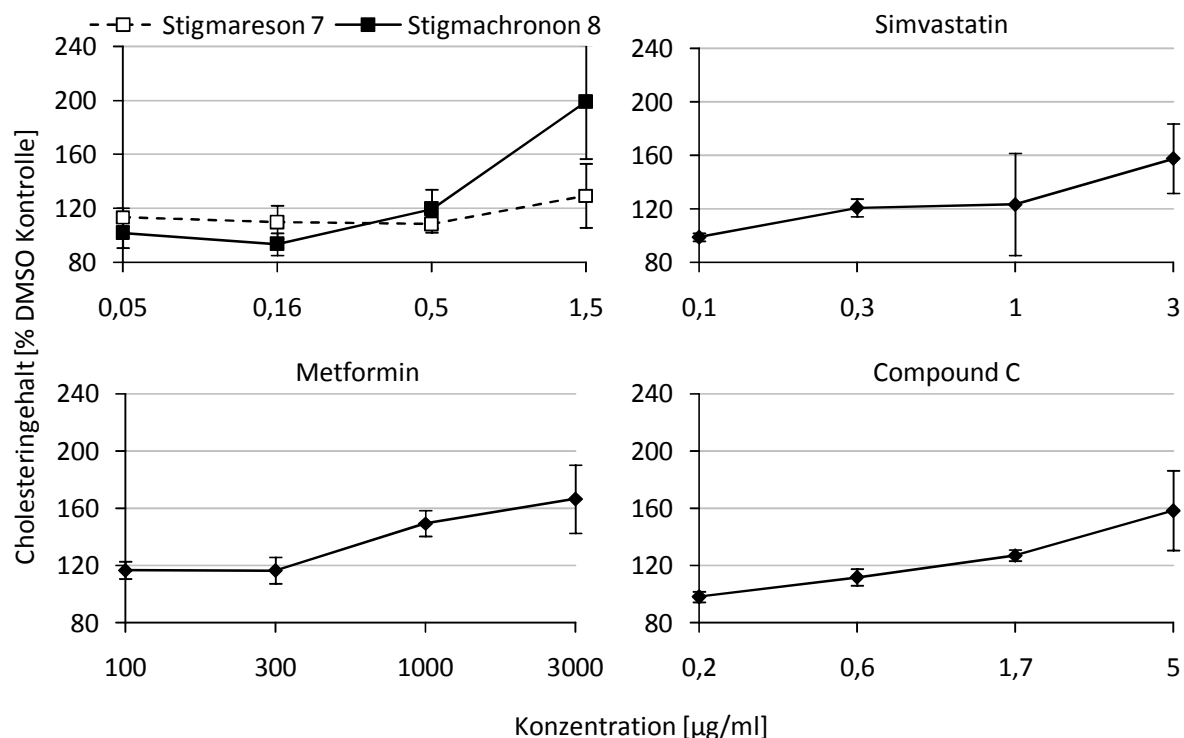


Abb. 3.37: Cholesteringehalt der A549 Zelllinie unter dem Einfluss der Stigmate. Nach 48 h Behandlung mit Stigmareson 7, Stigmachronon 8, Simvastatin, Metformin und Compound C in einer Mikrotiterplatte wurde der Cholesteringehalt der Zellen mithilfe einer Filipin-Färbung quantifiziert. Aufgrund der Behandlung mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen lagen nach 48 h unterschiedliche Zellzahlen vor. Zur Zellzahlbestimmung wurde der DNA-Gehalt der Zellen durch eine zusätzlich Färbung mit PI bestimmt. Anschließend wurde der Quotient aus Filipin-Fluoreszenz zu PI-Fluoreszenz berechnet und der Wert der DMSO-Kontrolle 100 % gesetzt.

Zellmembran lokalisiert war. Eventuell waren die Cholesterinmoleküle agglomeriert, weshalb der Transport zur Membran nicht ablaufen konnte.

Aufgrund des schnellen Ausbleichens von Filipin war eine Bestimmung des Cholesteringehaltes über Mikroskopaufnahmen nicht möglich. Daher wurde in einem weiteren Experiment die Filipin-Fluoreszenz mithilfe eines Messgerätes quantifiziert (Abb. 3.37). Hier wurde der untersuchte Konzentrationsbereich der Stigmate auf 1,5 µg/ml ausgeweitet und es wurde ein Effekt auf den Cholesteringehalt festgestellt. Die Cholesterinmenge der Stigmachronon 8-behandelten Zellen stieg bei 1,5 µg/ml auf 200 % der DMSO Kontrolle an, wohingegen sich der Cholesteringehalt der 1,5 µg/ml Stigmareson 7 Probe lediglich um 20 % erhöhte. Dies impliziert anstatt einer Aktivierung eine Hemmung der AMPK, welches sich in einer erhöhten Cholesterinproduktion äußern würde. Somit stimmt dieses Ergebnis nicht mit der Hypothese überein, dass die Stigmate eine Aktivierung der AMPK und damit verbunden einen reduzierten Cholesteringehalt bewirken könnten.

Das Ergebnis der Negativkontrollen entsprach ebenfalls nicht der Erwartung. Sowohl bei dem Simvastatin- als auch Metformin-Ansatz sollte eine Verringerung des Cholesteringehaltes

auftreten. Dennoch wurde bei beiden Negativkontrollen als auch bei der Positivkontrolle Compound C ein Anstieg der Cholesterinmenge auf 160 % verzeichnet.

Im physiologischen Zustand besitzt die AMPK eine basale Aktivität, da neben ATP auch immer eine geringe Menge AMP vorhanden ist (Ma *et al.*, 2012; Hardie *et al.*, 2006), das an einige AMPK Moleküle bindet und deren Phosphorylierung ermöglicht (Xiao *et al.*, 2007). Für Metformin konnte nicht gezeigt werden, dass dieses die AMPK über den basalen Zustand hinaus aktivierte. Hypothetisch sollte die aktivierte AMPK den Mevalonat Syntheseweg und auch die Bildung von Cholesterin hemmen. Jedoch wurde anstelle einer Verringerung eine Erhöhung des Cholesteringehaltes in den mit Metformin behandelten Zellen nachgewiesen. Ebenso wurde durch die Behandlung mit Simvastatin, welches den Mevalonat Syntheseweg inhibiert, eine geringere Cholesterinproduktion erwartet. Dennoch wurde auch hier eine erhöhte Cholesterinmenge nachgewiesen.

Lediglich bei Compound C stimmte der Anstieg der Cholesterinmenge mit der Hypothese überein, dass Compound C die Phosphorylierung der AMPK inhibiert und eine Überproduktion von Mevalonat und Cholesterin verursacht.

Da die Ergebnisse zur Cholesterinquantifizierung sowohl für die Negativkontrollen als auch für die Stigmate nicht mit den Hypothesen übereinstimmten, kann aufgrund dessen keine Aussage getroffen werden, inwiefern die Stigmate die AMPK eventuell beeinflussen.

### **3.2.5.3 Die AMPK der A549 Zelllinie wird unter dem Einfluss der Stigmate nicht phosphoryliert**

Im vorherigen Versuch sollte der Nachweis zur Aktivität der AMPK indirekt über den Cholesteringehalt des A549 Zellen erfolgen, d.h. dass das Cholesterin das Endprodukt von mehreren zwischengeschalteten Synthesewegen war, welche auf der Regulierung der AMPK basieren (Abb. 3.36 & 3.37). Um die Hypothese einer Aktivierung der AMPK durch die Stigmate auf direkte Weise zu überprüfen, wurde im folgenden Experiment der Phosphorylierungszustand der AMPK auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden die A549 Zellen über 0 h, 12 h, 24 h und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen Stigmachronon 8, Stigmareson 7, Metformin sowie Compound C behandelt und der Phosphorylierungszustand der AMPK wurde mit zwei unterschiedlichen Antikörpern in einem Western Blot analysiert (Abb. 3.38). Zum einen handelte es sich hierbei um den Antikörper Anti-phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172), mit welchem ausschließlich die phosphorylierte AMPK detektiert wird. Zum anderen wurde der Antikörper Anti-AMPK $\alpha$ 1 verwendet, der sowohl an phosphorylierte als

auch an nicht phosphorylierte AMPK Proteine bindet. Anhand des Western Blots konnte mit dem Anti-AMPK $\alpha$ 1 Antikörper nachgewiesen werden, dass das AMPK Protein in allen Ansätzen vorlag. Im Gegensatz dazu erschienen bei allen Proben nur sehr schwache Banden bei der Detektion der phosphorylierten AMPK. Dabei war nicht eindeutig festzustellen, ob es sich um eine spezifische Bindung des Anti-phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172) Antikörpers oder um Hintergrund handelte. Auszuschließen war eine Inaktivierung des Antikörpers, da in späteren Experimenten mit Makrophagen die Detektion der phosphoryliertem AMPK erfolgreich war (persönliche Mitteilung von Karin Plank-Schumacher, AG BISA, HZI).

In der Annahme, dass eine spezifische Antikörper-Bindung vorlag, konnte anhand der Medium-Kontrollen sowie der Lösungsmittelkontrollen davon ausgegangen werden, dass im Grundzustand nur ein sehr geringer Anteil an AMPK Proteinen phosphoryliert war. Bei den Ansätzen mit der Negativkontrolle Compound C und der Positivkontrolle Metformin wurde kein Unterschied in der Bandenstärke der phosphorylierten AMPK zu den Medium- und Lösungsmittelkontrollen festgestellt. Unter dem Einfluss von Compound C wurde eine verringerte Phosphorylierung der AMPK erwartet. Da jedoch der basale Phosphorylierungszustand bereits sehr gering war, konnte keine Aussage dazu getroffen werden, ob sich der Anteil an phosphorylierter AMPK durch die Compound C Behandlung gegenüber den Kontrollen verringert hatte.

Für die Positivkontrolle Metformin wurde eine erhöhte Phosphorylierung der AMPK angenommen, welche ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich war der Grund für das negative Ergebnis der Positivkontrolle in der Interaktion zwischen Metformin und den A549 Zellen zu suchen. Im AMPK Signalweg tierischer Zellen erfolgt die Phosphorylierung der AMPK unter anderem über die AMPK Kinase LKB1 (Leberkinase B1) (Shaw *et al.*, 2004). Der Wirkmechanismus von Metformin ist bislang nicht eindeutig geklärt. Bislang wurde angenommen, dass Metformin die AMPK indirekt aktiviert, indem Metformin eine Aktivierung der LKB1 hervorruft (Liu *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2004). Jedoch ist die LKB1 in der A549 Zelllinie nicht vorhanden (Liu *et al.*, 2011b; Gusarova *et al.*, 2009). In Adenokarzinomzellen findet häufig die Deletion eines chromosomalen Armes statt, auf welchem das LKB-1 Gens lokalisiert ist (Sanchez-Cespedes *et al.*, 2002). Daher kann eine indirekte Aktivierung der AMPK durch Metformin nicht erfolgen (Liu *et al.*, 2011b). Anstattdessen wird in A549 Zellen die AMPK über die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase (CaMKK $\beta$ ) phosphoryliert, deren Aktivierung über einen Anstieg von intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentrationen abhängig zu sein scheint (Ma *et al.*, 2012). Daher war im Western Blot die Kombination aus A549 Zellen und Metformin als Positivkontrolle nicht

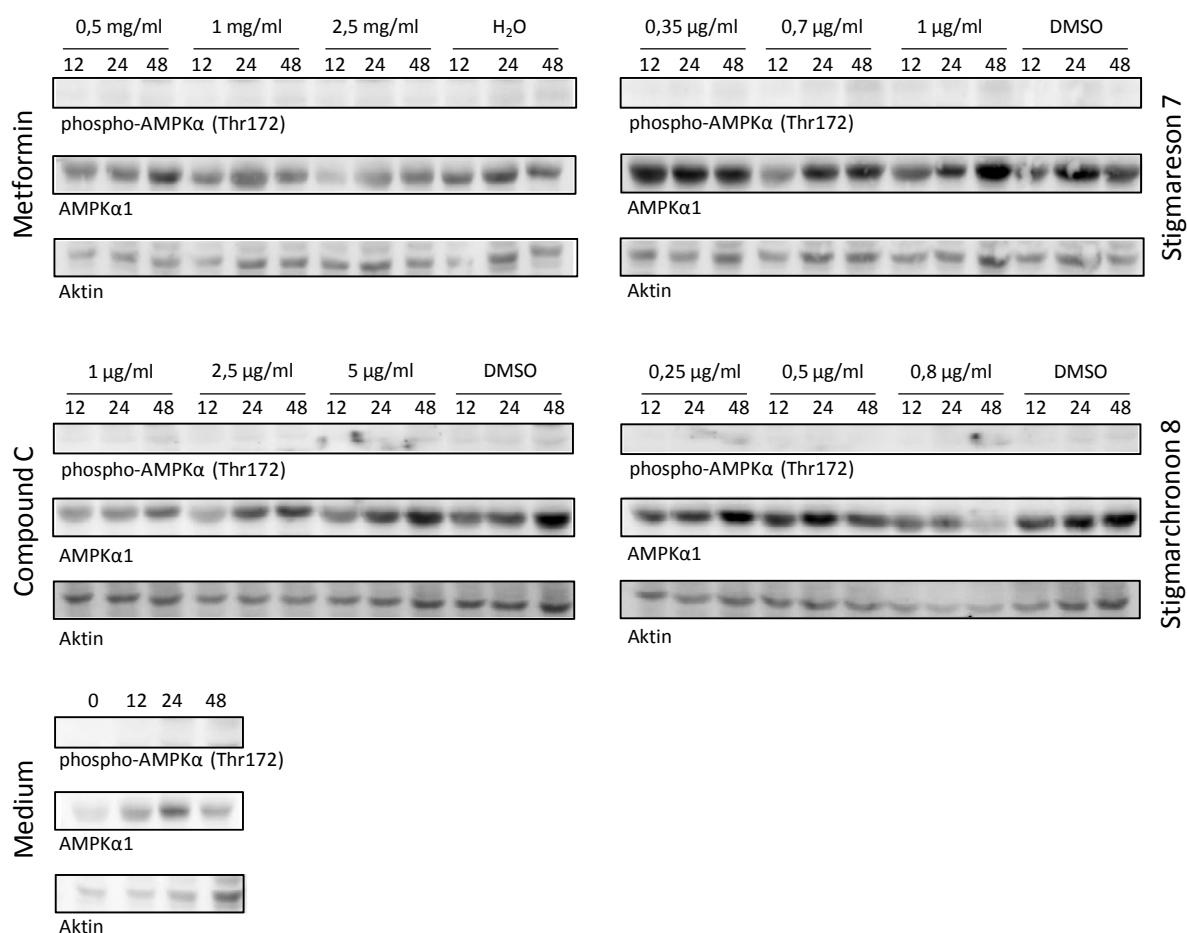


Abb. 3.38: Regulierung des Phosphorylierungszustandes der AMPK in der A549 Zelllinie unter dem Einfluss der Stigmate. Die Zellen wurden mit jeweils drei Konzentrationen Stigmareson 7, Stigmachronon 8, der Positivkontrolle Metformin und der Negativkontrolle Compound C behandelt. Nach 12 h, 24 h und 48 h wurden Proben genommen und in einem Western Blot erfolgte die Proteindetektion mit den Primärantikörpern Anti-phospho-AMPKα (Thr172) und Anti-AMPKα1. Der Anti-Aktin Antikörper wurde als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge verwendet. Als Sekundärantikörper diente Anti-Rabbit IgG-HRP.

geeignet, da aufgrund einer Metformin-Behandlung keine Phosphorylierung der AMPK erfolgen würde. Die fehlende Wirkung von Metformin erklärt dennoch nicht das Ergebnis der Cholesterinquantifizierung, bei der eine Erhöhung des Cholesteringehaltes der A549 Zellen unter dem Einfluss von Metformin zu beobachten gewesen war (Abb. 3.37). Darüberhinaus zeigte das Ergebnis der MTT Tests, dass die Zytotoxizität von Metformin erst im mg/ml-Konzentrationsbereich begann, welches möglicherweise nicht auf die primäre Wirkung, sondern auf toxische Sekundäreffekte des Metformins zurückzuführen war (Abb. 3.35).

Des Weiteren wurde weder eine Phosphorylierung noch eine Dephosphorylierung der AMPK unter dem Einfluss von Stigmareson 7 und Stigmachronon 8 beobachtet (Abb. 3.38). Aufgrund der fehlenden Nachweise der Kontrollen in diesem Western Blot konnte nur geschlossen werden, dass die Stigmate zu den untersuchten Zeitpunkten keine Veränderungen in der AMPK-Phosphorylierung hervorriefen. Beispielsweise könnte die AMPK bereits

innerhalb der ersten 12 h der Behandlung phosphoryliert und bis zum 12 h Probenzeitpunkt bereits wieder dephosphoryliert worden sein. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Stigmate zwar eine Inhibierung der AMPK Phosphorylierung verursachten, welche aber aufgrund des geringen basalen Phosphorylierungslevels der AMPK nicht ersichtlich war. Die letzte Option wäre, dass die Stigmate nicht an der Regulierung des Phosphorylierungszustandes der AMPK beteiligt sind.

### **3.2.6 Das hypothetische *Staphylococcus aureus* Protein SAOUHSC\_02659 codiert für einen Tetrazyklin Repressor**

Die bislang verfolgten Hypothesen bezüglich einer Wirkung der Stigmate auf den Mevalonat Syntheseweg, auf die bakterielle Glykolyse oder auf die tierische AMPK führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Daher sollte mit einer anderen Vorgehensweise das Target von Stigmachronon 8 in *S. aureus* identifiziert werden. Die Entstehung von Resistenzen begründet sich häufig auf dem Austausch von Nukleotiden in dem DNA-Bereich, der höchstwahrscheinlich das Target eines Antibiotikums ist. In einem vorwärtsgerichteten genetischen Ansatz kann zur Targetidentifizierung eine Mutante generiert werden, die spontan eine Resistenz gegenüber dem Wirkstoff erworben hat. Eine derartige Mutation tritt häufig in einer Bindungsstelle des Targetproteins auf, wodurch die Interaktion mit dem Wirkstoff verhindert wird (Ho *et al.*, 2011). Zu diesem Zweck wurde ein gegen Stigmachronon 8 resistenter *S. aureus* Stamm hergestellt, dessen Genom auf Mutationen untersucht wurde, die unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 entstanden waren.

Für diesen Versuch wurde der *S. aureus* NCTC 8325-Laborstamm ausgewählt, da dessen Genom bereits sequenziert und annotiert wurde. Zuerst wurde eine Kolonie des NCTC 8325-Stammes als Grundlage verwendet, um in einem Wachstumstest dessen MIC gegenüber Stigmachronon 8 zu bestimmen (Abb. 3.39). Mit dieser Kolonie wurde zusätzlich ein Backup hergestellt, indem ein Teil der Bakterien erneut ausplattiert wurde. Auf der Basis des Wachstumstests wurde für diese Bakterien eine MIC von 50 ng/ml festgelegt. Für die Herstellung eines resistenten Stammes wurde die zehnfache Konzentration der MIC (10x MIC) verwendet, daher wurden Trypton Soja Agar Platten mit einer Stigmachronon 8 Konzentration von 500 ng/ml hergestellt. Eine exponentiell wachsende Bakterienkultur, angeimpft mit einer Kolonie von der Backup-Platte, wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 10 eingestellt und auf den Stigmachronon 8-Agarplatten ausplattiert. Von den gewachsenen Kolonien wurde wiederum jeweils eine Kolonie auf einer zweiten Stigmachronon 8-Agarplatte kultiviert. Mit



einer Kolonie aus dem zweiten Durchgang wurde anschließend der Wachstumstest mit Stigmachronon 8 wiederholt, um die Sensitivität der vermutlich resistenten Kolonie beurteilen zu können (Abb. 3.39). Hier zeigte sich, dass die neue MIC bei einer Konzentration von

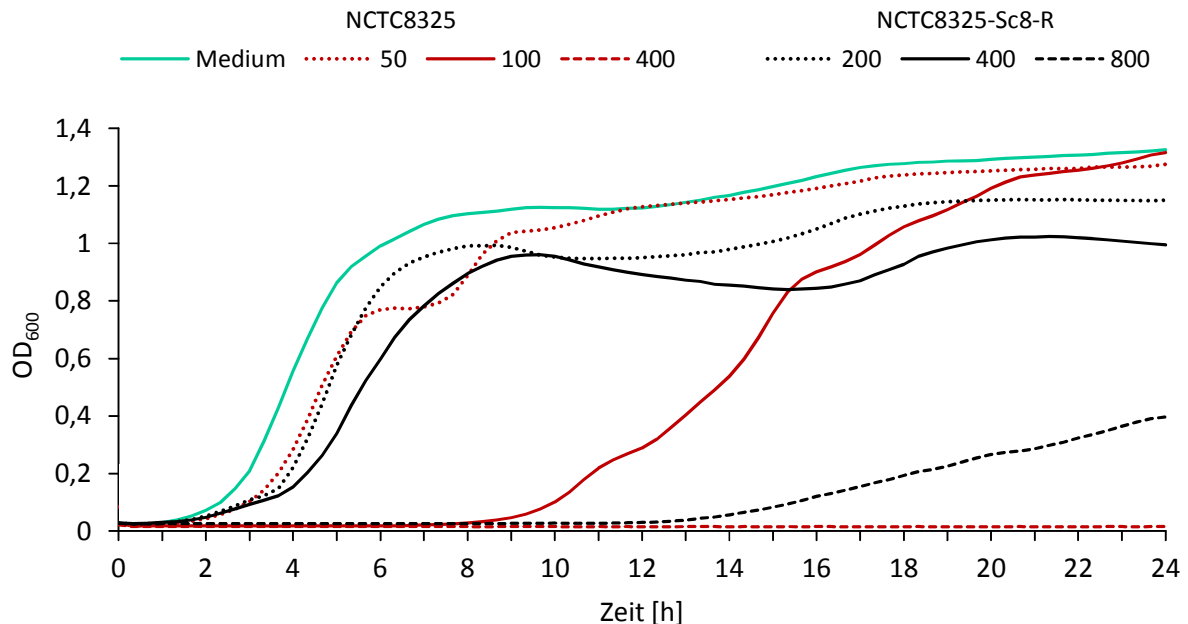


Abb. 3.39: Wachstum von *S. aureus* NCTC 8325 und NCTC 8325-Sc8-R mit Stigmachronon 8. Der NCTC 8325-Laborstamm und der Stigmachronon 8 resistente Stamm NCTC 8325 (NCTC 8325-Sc8-R) wurden mit 8 Replika pro Stigmachronon 8 Konzentration über 24 h bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Die OD<sub>600</sub> wurde alle 20 min gemessen.

200 ng/ml anstatt vorher bei 50 ng/ml lag. Damit wurde bestätigt, dass der mit einer 10x MIC Stigmachronon 8-behandelte Stamm eine Resistenz gegenüber Stigmachronon 8 ausgebildet hatte. Daraufhin wurde die 2,8 Mb große genomische DNA des resistenten sowie des ursprünglichen NCTC 8325-Stammes isoliert und das Genom wurde sequenziert (Sabin Bhuj, AG GMAK, HZI). Bei einem Sequenzabgleich („genecoverage“) mit dem annotierten Stamm wurde festgestellt, dass im Genom beider sequenzierter Stämme jeweils vier größere zueinander identische DNA-Abschnitte deletiert waren (Tab. 3.3). Da die Deletionen sowohl im resistenten Stamm als auch im unbehandelten Stamm auftraten, sollte kein Zusammenhang mit der Stigmachronon 8-Behandlung bestehen. Bei den deletierten Genen handelte es sich um Proteine mit bekannten Funktionen, aber auch um eine Vielzahl hypothetischer Proteine, sowie Proteine, deren Funktion in Verbindung mit (Bakterio)Phagen stehen und orf (open reading frame)-ähnliche Proteine (Tab. 3.4). Die unerwartet gefundenen Deletionen dieser Gene waren offensichtlich für *S. aureus* NCTC 8325 Stamm war unwahrscheinlich, da die

Wachstumsanalysen des NCTC 8325 Stammes und dem klinischen MRSA-Isolat eine sehr ähnliche Sensitivität der Stigmata auf beide Stämme zeigten (Abb. 3.2).

Tab. 3.3: Locus und Größe der Deletionen im Genom von *S. aureus* NCTC 8325 und NCTC 8325-Sc8-R.

Deletion (von..bis, bp)	Größe (bp)
757479..758673	1195
1462575..1508577	46003
1923408..1966997	43590
2031924..2074631	42708

Tab. 3.4: Deletierte Gene im Genom von *S. aureus* NCTC 8325.

Hypothetische Proteine	
SAOUHSC_00778, SAOUHSC_01514, SAOUHSC_01517, SAOUHSC_01518, SAOUHSC_01522, SAOUHSC_01526, SAOUHSC_01527, SAOUHSC_01530, SAOUHSC_01533, SAOUHSC_01535, SAOUHSC_01541, SAOUHSC_01544, SAOUHSC_01545, SAOUHSC_01546, SAOUHSC_01547, SAOUHSC_01548, SAOUHSC_01550, SAOUHSC_01551, SAOUHSC_01555, SAOUHSC_01557, SAOUHSC_01559, SAOUHSC_01560, SAOUHSC_01565, SAOUHSC_01567, SAOUHSC_01568, SAOUHSC_01569, SAOUHSC_01572, SAOUHSC_01573, SAOUHSC_01577, SAOUHSC_02015, SAOUHSC_02016, SAOUHSC_02017, SAOUHSC_02018, SAOUHSC_01579, SAOUHSC_02031, SAOUHSC_02034, SAOUHSC_02035, SAOUHSC_02037, SAOUHSC_02044, SAOUHSC_02046, SAOUHSC_02054, SAOUHSC_02055, SAOUHSC_02056, SAOUHSC_02058, SAOUHSC_02065, SAOUHSC_02066, SAOUHSC_02068, SAOUHSC_02072, SAOUHSC_02073, SAOUHSC_02075, SAOUHSC_02079, SAOUHSC_02081, SAOUHSC_02085, SAOUHSC_02087, SAOUHSC_02164, SAOUHSC_02165, SAOUHSC_02166, SAOUHSC_02167, SAOUHSC_02175, SAOUHSC_02176, SAOUHSC_02177, SAOUHSC_02179, SAOUHSC_02183, SAOUHSC_02189, SAOUHSC_02190, SAOUHSC_02198, SAOUHSC_02200, SAOUHSC_02202, SAOUHSC_02203, SAOUHSC_02204, SAOUHSC_02205, SAOUHSC_02206, SAOUHSC_02209, SAOUHSC_02212, SAOUHSC_02214, SAOUHSC_02215, SAOUHSC_02218, SAOUHSC_02221, SAOUHSC_02222, SAOUHSC_02225, SAOUHSC_02226, SAOUHSC_02227, SAOUHSC_02228, SAOUHSC_02236, SAOUHSC_02237, SAOUHSC_02040, SAOUHSC_A01455, SAOUHSC_A01514, SAOUHSC_A02094	
Enzyme mit bekannter Funktion	
petidoglycan hydrolase	SAOUHSC_01515
terminase-small subunit	SAOUHSC_01539
exonuclease family protein	SAOUHSC_01576
autolysin; K01447 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [EC:3.5.1.28]	SAOUHSC_02019
bifunctional autolysin (EC:3.5.1.28); K01446 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	SAOUHSC_02023
dUTP pyrophosphatase (EC:3.6.1.23); K01520 dUTP pyrophosphatase [EC:3.6.1.23]	SAOUHSC_02057
peptidoglycan hydrolase	SAOUHSC_02170
staphylokinase; K14198 staphylokinase	SAOUHSC_02171
prohead protease; K06904	SAOUHSC_02193
Amidase	SAOUHSC_02173
Integrase	SAOUHSC_02239
scaffolding protease	SAOUHSC_01536
excisionase-like protein	SAOUHSC_02088

Proteine mit bekannter Funktion	
Holin	SAOUHSC_02020
holin protein	SAOUHSC_01516
holin-like protein	SAOUHSC_01524
major tail protein	SAOUHSC_01529
tail length tape measure protein	SAOUHSC_02182
SNF2 family protein	SAOUHSC_01542
phi related protein	SAOUHSC_01543
transcriptional activator rinB-like protein	SAOUHSC_01549
transcriptional activator rinb-like protein	SAOUHSC_02053
helix-turn-helix domain-containing protein	SAOUHSC_01574
helix-turn-helix domain-containing protein	SAOUHSC_01575
helix-turn-helix DNA binding protein	SAOUHSC_02062
single-strand DNA-binding protein	SAOUHSC_02071
int gene activator RinA	SAOUHSC_02051
chemotaxis-inhibiting protein CHIPS; K14202 chemotaxis inhibitory protein	SAOUHSC_02169
anti repressor; K07741 anti-repressor protein	SAOUHSC_02229
anti repressor; K07741 anti-repressor protein	SAOUHSC_02231
repressor-like protein	SAOUHSC_02234
Repressor	SAOUHSC_02235

(Bakterio)phagen Proteine	
bacteriophage L54alg-like domain-containing protein	SAOUHSC_01528
bacteriophage L54a, HNH endonuclease family protein	SAOUHSC_01540
bacteriophage L54a, deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase (EC:3.6.1.23);	SAOUHSC_01552
bacteriophage integrase	SAOUHSC_01582
bacteriophage L54a, DnaB-like helicase family protein	SAOUHSC_02067
bacteriophage L54a, antirepressor	SAOUHSC_02080
bacteriophage L54a, Cro-like protein	SAOUHSC_02083
phage repressor protein	SAOUHSC_02084
phage tail fiber protein	SAOUHSC_02022
phage head protein	SAOUHSC_02043
phage head morphogenesis protein	SAOUHSC_02047
phage tape measure protein	SAOUHSC_02033
phage structural protein	SAOUHSC_02036
phage encoded DNA polymerase I (EC:2.7.7.7); K02334 DNA polymerase bacteriophage	SAOUHSC_01563
phage tail tape measure protein	SAOUHSC_01525
phage terminase large subunit	SAOUHSC_01538
HK97 family phage portal protein	SAOUHSC_01537
HK97 family phage protein	SAOUHSC_02038
HK97 family phage protein	SAOUHSC_02187
HK97 family phage major capsid protein	SAOUHSC_02191
HK97 family phage portal protein	SAOUHSC_02194
phage family integrase	SAOUHSC_02089
phage phi LC3 family holing	SAOUHSC_02174
phage minor structural protein	SAOUHSC_02180
phage head-tail adaptor	SAOUHSC_02188
phage terminase large subunit	SAOUHSC_02196
phage terminase small subunit	SAOUHSC_02197

phage DnaC-like protein	SAOUHSC_02216
terminase small subunit; K07474 phage terminase small subunit	SAOUHSC_02050
SPP1 family phage portal protein	SAOUHSC_02048
PBSX family phage terminase large subunit; K06909 phage terminase large subunit	SAOUHSC_02049

ORF ähnliche-Proteine			
SLT orf 129-like protein	SAOUHSC_01519	phi ETA orf 18-like protein	SAOUHSC_02220
SLT orf 488-like protein	SAOUHSC_01520	phi Mu50B-like protein	SAOUHSC_02041
SLT orf 636-like protein	SAOUHSC_01521	phi Mu50B-like protein	SAOUHSC_02042
SLT orf 527-like protein	SAOUHSC_01523	phi PVL ORF 30-like protein	SAOUHSC_01580
SLT orf 123-like protein	SAOUHSC_01531	phi PVL orf 14-like protein	SAOUHSC_02184
SLT orf 110-like protein	SAOUHSC_01532	phi PVL orf 13-like protein	SAOUHSC_02185
SLT orf 71-like protein	SAOUHSC_01571	phi PVL orf 12-like protein	SAOUHSC_02186
phi SLT orf 99-like protein	SAOUHSC_02025	phi PVL orf 52-like protein	SAOUHSC_02059
SLT orf 129-like protein	SAOUHSC_02027	phi PVL orf 51-like protein	SAOUHSC_02060
PVL orf 37-like protein	SAOUHSC_01570	phi PVL orf 50-like protein	SAOUHSC_02061
PVL orf 52-like protein	SAOUHSC_01553	phi PVL orf 39-like protein	SAOUHSC_02074
PVL orf 52-like protein	SAOUHSC_01556	phi PVL orf 38-like protein	SAOUHSC_02076
PVL orf 51-like protein	SAOUHSC_01558	phi PVL orf 22-like protein	SAOUHSC_02178
PVL orf 50-like protein	SAOUHSC_01561	phi PVL orf 51-like protein	SAOUHSC_02210
PV83 orf 27-like protein	SAOUHSC_02208	phi PVL orf 50-like protein	SAOUHSC_02211
PV83 orf 23-like protein	SAOUHSC_02063	phi PVL orf 62-like protein	SAOUHSC_02199
PV83 orf 4-like protein	SAOUHSC_02086	phi PVL/orf 52-like protein	SAOUHSC_02207
PV83 orf 27-like protein	SAOUHSC_01554	phi PVL orf 39-like protein	SAOUHSC_02223
ETA orf 26-like protein	SAOUHSC_01562	phi PVL orf 38-like protein	SAOUHSC_02224
phi APSE P51-like protein	SAOUHSC_01566	phi PVL orf 3-like protein	SAOUHSC_02195
phi ETA orf 63-like protein	SAOUHSC_02021	phi PVL orf 33-like protein	SAOUHSC_02232
phi ETA orf 58-like protein	SAOUHSC_02026	phi PVL orf 32-like protein	SAOUHSC_02233
phiETA ORF57-like protein	SAOUHSC_02028	phi PVL orfs 18-19-like protein	SAOUHSC_02181
phi ETA orf 56-like protein	SAOUHSC_02029	phi PVL ORF 30-like protein	SAOUHSC_02238
phi ETA orf 55-like protein	SAOUHSC_02030	phi PV83 orf 20-like protein	SAOUHSC_02069
phi ETA orf 25-like protein	SAOUHSC_02064	phi PV83 orf 19-like protein	SAOUHSC_02070
phi ETA orf 25-like protein	SAOUHSC_02213	phi PV83 orf 12-like protein	SAOUHSC_02077
phi ETA orf 22-like protein	SAOUHSC_02217	phi PV83 orf 10-like protein	SAOUHSC_02078
phi ETA orf 20-like protein	SAOUHSC_02219		

Die Analyse der Sequenzierungsdaten ergab eine Punktmutation in dem hypothetischen Protein SAOUHSC\_02659 (Tab. 3.5). Hier fand in dem Triplet tta ein Austausch des Nukleotids Adenin zu Cytosin statt, welches einen Austausch der Aminosäure Leucin zu Phenylalanin hervorrief. Sowohl das aliphatische Leucin als auch das aromatische Phenylalanin sind neutral und unpolar sowie in der Lage, hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins auszubilden. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen Aminosäuren ist, dass Phenylalanin ( $C_9H_{11}NO_2$ ) größer als Leucin ( $C_6H_{13}NO_2$ ) ist. Aufgrund seiner Größe könnte Phenylalanin die Proteinfaltung verändern und die Proteinaktivität beeinflussen. Aber ebenso bestand die Möglichkeit, dass die Mutation keinerlei

Auswirkungen auf die Proteinstruktur und in Folge auch nicht auf die Aktivität des Proteins hatte.

Da es sich um ein hypothetisches Protein handelte, konnte über die Funktion mithilfe von Datenbanken lediglich spekuliert werden. In einer generellen Annotation gab UniProt eine Sequenzähnlichkeit zu einer HTH (helix-turn-helix) tetR-typ DNA-bindenden Domäne an. Des Weiteren nannte NCBI zwei konservierte Domänen. Zum einen handelte es sich um TetR\_C\_8 (pfam14278), einem Transkriptionsregulator bzw. Tetrazyklin Repressor. Zum anderen beinhaltet das Protein SAOUHSC\_02659 eine DHAK (Dihydroxyacetonkinase) regulatorische Domäne (TIGR02366), die für einen putativen Dihydroxyacetonkinase Regulator kodiert.

Zusätzlich zu den unerwartet gefundenen Deletionen im *S. aureus* NCTC 8325 Genom waren außerdem in der Durchführung des Versuchs mehrere Fehlerquellen vorhanden. Zunächst war nicht auszuschließen, dass in einem *S. aureus* NCTC 8325 Stamm ohne Deletionen unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 eine oder mehrere andere Mutationen entstanden wären. Darüber hinaus hätte eine Stigmachronon 8-Behandlung mit einer geringeren Konzentration als der 10x MIC ebenfalls für die Erzeugung resistenter Stämme ausreichend sein können, zumal in den Wachstumsanalysen bereits resistente Stämme in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 200 ng/ml auftraten (Abb. 3.39). Infolgedessen wäre das Auftreten anderer Mutationen bedingt durch einen geringeren Selektionsdruck sehr wahrscheinlich. Zusätzlich hätte die Sequenzierung von mehreren resistenten Kolonien eine größere Wahrscheinlichkeit ergeben, dass die Entstehung der gefundenen Mutation nicht zufällig war, sondern mit einer gewissen Häufigkeit auftrat.

Tab. 3.5: Punktmutation im hypothetischen Protein SAOUHSC\_02659 des *S. aureus* Stigmachronon 8- resistenten Stammes NCTC 8325. Die mutierte Aminosäure bzw. das mutierte Nukleotid sind rot hervorgehoben.

<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> NCTC 8325	
Genname	SAOUHSC_02659
Definition	Hypothetisches Protein
Locus	YP_501121.1
Sequenzähnlichkeit	HTH (helix-turn-helix) tetR-typ DNA-bindende Domäne
Ontologie	Regulation der Transkription
Motive	TetR_C_8 [pfam14278]: Transkriptionsregulator C-terminale Region, Tetrazyklin Repressor DHAK_reg [TIGR02366]: Putativer Dihydroxyaceton Kinase Regulator
Position im Genom	2443229..2443852
Sequenz Aminosäuren	207 Aminosäuren MKEDRRIRKTKSSIKQAF TKLLQEKDLEKITIRDITTRADINRGTFYLHY EDKYMLLADMEDEYISELTTYTQFDLLRGSSIEDIANTFVNNILKNIFQH IHDNLEFYHTILQLERTS <del>Q</del> LELKINEHIKNNMQRYISINHSIGGVPEMYF YSYVSGATISIIKYWVMDKQPISVDELA KHVHNIIFNGPLRIMAENRLH KSNLDSL T
Sequenz Nukleotide	624 Nukleotide ttgaaagaagataggcgaattagaa <sup>25</sup> agacaaagtcctccattaacaagc <sup>50</sup> gttcactaaattactacaagaaa aa <sup>75</sup> gatttagaaaagattaccattcgcg <sup>100</sup> acataacaacacgcgctgatataa <sup>125</sup> tagaggacattttactta cattac <sup>150</sup> gaggataaatatattgtactcgcag <sup>175</sup> atatggaagatgagtatatattcaga <sup>200</sup> actaacgacatatac tcaatttgat <sup>225</sup> ttgttacgcggttctcaattgaag <sup>250</sup> acattgcgaatacttttgtaaataa <sup>275</sup> tataactcaaaaatat ttccaacat <sup>300</sup> attcatgataatttagagttttatc <sup>325</sup> atactattttacaattggaacgcac <sup>350</sup> gagtcaatt <del>aga</del> att gaaaatcaac <sup>375</sup> gaacatattaaaaataatgcaac <sup>400</sup> gttacattagtagtatcaatcattctat <sup>425</sup> cggaggcggttc cagagatgtatttt <sup>450</sup> tacagttacgttccggagcaacaa <sup>475</sup> tttcaattattaaatactgggtaaat <sup>500</sup> ggacaaac agcccatttcagttgat <sup>525</sup> gaattagctaaacagtgcataatat <sup>550</sup> tatttttaatgtgtccattaagaata <sup>575</sup> atggca gaaaaccgtttgcataaat <sup>600</sup> caaaccttgattcactaacttaa
Position Punktmutation	Genom: 2443588 a>c Gen: 360 a>c Protein: Leu120Phe
Quellen	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/88196299">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/88196299</a> <a href="http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?sao:SAOUHSC_02659">http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?sao:SAOUHSC_02659</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=SAOUHSC_02659">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=SAOUHSC_02659</a> <a href="http://www.uniprot.org/uniprot/Q2FVP3">http://www.uniprot.org/uniprot/Q2FVP3</a>

### 3.2.6.1 Die wachstumsinhibierende Wirkung von Stigmachronon 8 auf *Staphylococcus aureus* wird durch Zugabe von Tetrazyklin verstärkt

Bei der Genomanalyse eines induzierten Stigmachronon 8-resistenten *S. aureus* NCTC 8325 Stammes wurde eine Mutation in einer DNA-Region gefunden, die für ein hypothetisches Protein kodierte. Dieser DNA-Abschnitt besaß eine Sequenzähnlichkeit zu einer HTH tetR-typ DNA-bindenden Domäne, bei der es sich um einen Tetrazyklin Repressor handeln könnte. Ein Resistenzmechanismus von Bakterien ist die Ausschleusung von Tetrazyklin durch einen transkriptionell regulierten und Efflux-basierten Transport aus der Zelle, welcher von Proteinen der Tet-Familie reguliert wird (Levy und McMurray, 1974; McMurry *et al.*, 1980; Hinrichs *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1990b). Zu dieser Familie gehören auch die Tetrazyklin Repressor Proteine. Aus diesem Grund war es naheliegend, die Auswirkung von Tetrazyklin auf das bakterielle Wachstum unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 zu untersuchen. Dazu wurde *S. aureus* mit Stigmachronon 8 und Tetrazyklin einzeln und in Kombination behandelt (Abb. 3.40).

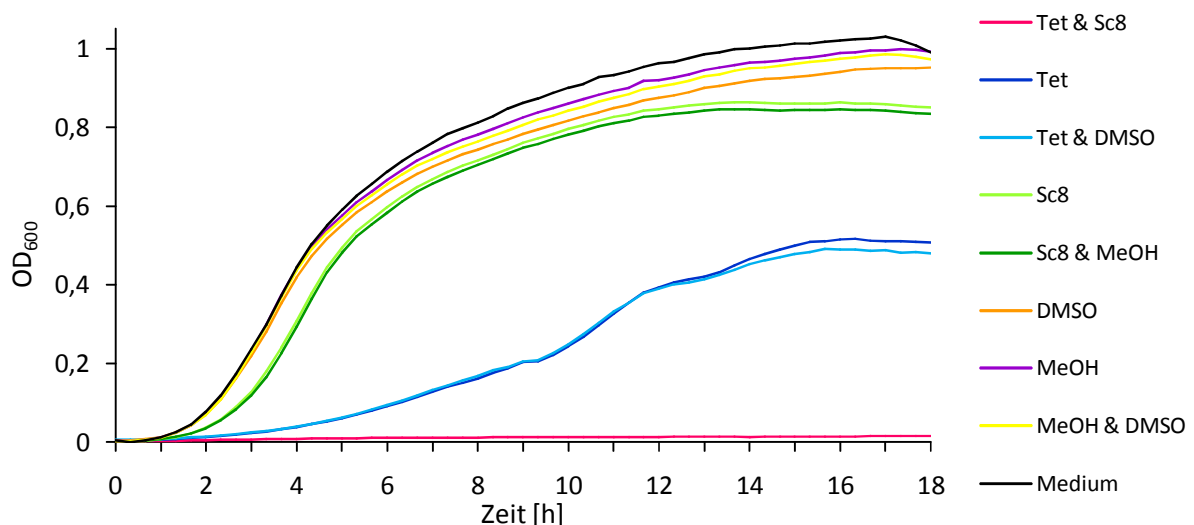


Abb. 3.40: Wachstum von *S. aureus* NCTC 8325 unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 (Sc8) in Kombination mit Tetrazyklin (Tet). Sowohl die beiden Wirkstoffe als auch die entsprechenden Lösungsmittel wurden in allen Kombinationsmöglichkeiten getestet. Stigmachronon 8 wurde in einer Konzentration von 200 ng/ml und Tetrazyklin in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. In den Kontrollen wurde die gleiche Menge an Lösungsmittel (MeOH für Tetrazyklin; DMSO für Stigmachronon 8) verwendet, die auch in den Wirkstoffansätzen vorlag. Alle Ansätze wurden in vier Replika durchgeführt.

Die zwei Ansätze mit 200 ng/ml Stigmachronon 8 sowie Stigmachronon 8 & MeOH wiesen eine schwache Inhibierung des Wachstums auf, welche sich in einem um ca. 1 h verzögerten Wachstumsstart im Vergleich zur Medium-Kontrolle äußerte. Bei der Bestimmung der MIC wurde zuvor für den NCTC 8325 Stamm behandelt mit Stigmachronon 8 ein Wert von 60

ng/ml festgestellt (Tab. 3.1). Die Konzentration von 60 ng/ml Stigmachronon 8 verursachte sogar eine stärkere Wachstumsinhibierung als bei diesem Versuch die Konzentration von 200 ng/ml. Die Ursache für diese verringerte Wirkung lag vermutlich an einer variablen Sensitivität der Bakterien. Um Mischkulturen von unterschiedlich sensitiven Bakterien zu vermeiden, wurde für jedes Experiment die ü.N. Kultur mit einer Einzelkolonie angeimpft. Außer der Sensitivität der Bakterien als Ursache, würde auch eine Degradierung des Wirkstoffes zu einer Abnahme der Wirkung führen. Dies konnte anhand einer HPLC-MS Analyse jedoch ausgeschlossen werden (persönliche Mitteilung von R. Jansen, AG MWIS, HZI).

Die Behandlung der Bakterien mit Tetrazyklin und Tetrazyklin & DMSO verursachte ein verzögertes Wachstum, welches sich in einem sehr langsamen Anstieg der OD<sub>600</sub> über die ersten 10 h der Behandlung zeigte. Die Absorption der Tetrazyklin-Proben lag nach 18 h bei ca. 0,45, wohingegen die Stigmachronon 8-Ansätze eine OD<sub>600</sub> von 0,8 und die Kontroll-Ansätze einen Wert von 0,9 erreichten. Somit zeigte sich unter dem Einfluss von Tetrazyklin ein anderes Wachstumsverhalten von *S. aureus* als bei der Behandlung mit Stigmaten.

Die Behandlung mit der Kombination aus Stigmachronon 8 und Tetrazyklin ergab eine vollständige Inhibierung des bakteriellen Wachstums. Möglicherweise deutete dies auf eine Verstärkung der toxischen Effekte der beiden Wirkstoffe hin, da Stigmachronon 8 und Tetrazyklin unabhängig voneinander lediglich ein verzögertes Wachstum und keinen totalen Wachstumsverlust verursachten. Einen Einfluss der beiden Lösungsmittel MeOH und DMSO auf den Effekt der Wirkstoffe konnte ausgeschlossen werden, weil das Wachstum der Bakterien behandelt mit Lösungsmitteln nahezu der Medium-Kontrolle entsprach.

Das Ergebnis dieses Experiments unterstützte das Resultat der Genomanalyse, bei der eine Mutation in einem DNA-Bereich gefunden wurde, der für einen Tetrazyklin Repressor codieren könnte. Möglicherweise wird Stigmachronon 8 auf die gleiche Weise wie Tetrazyklin von der Zelle exkretiert. Dabei kann vermutlich die kombinierte Zugabe beider Wirkstoffe nicht mehr durch den Tet-Resistenzmechanismus kompensiert werden, wodurch das bakterielle Wachstum vollständig gehemmt wird.



## 4. Diskussion

Das humanpathogene Bakterium *S. aureus* ist einer der häufigsten Auslöser von nosokomialen und ambulant erworbenen Infektionen. Da einige *S. aureus* Stämme die Fähigkeit besitzen, unter dem Einfluss von Antibiotika umgehend unterschiedliche Resistenzmechanismen zu aktivieren, ist *S. aureus* nicht selten ein schwer zu behandelnder Krankheitserreger (Deresinski, 2005; Bereket *et al.*, 2012). Aufgrund der Entwicklung von immer neuen Resistenzen werden daher dringend Wirkstoffe mit differenten Zielstrukturen benötigt.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden neue Sekundärmetabolite aus dem Myxobakterium *S. erecta* identifiziert, die eine antibakterielle Wirkung gegenüber verschiedenen Mikroorganismen zeigten. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Stigmachronon 6, Stigmachronon 8, Stigmareson 7 und Stigmareson 19.

Neue Wirkstoffkandidaten dürfen in erster Linie keine toxische Wirkung auf den Patienten haben und müssen gleichzeitig das Pathogen effektiv eliminieren. Das Verhältnis zwischen der antimikrobiellen Wirkung und der Zytotoxizität wird dabei als „therapeutischer Index“ bezeichnet. Dementsprechend war es ein Ziel dieser Arbeit, die neuen Wirkstoffkandidaten hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung gegen *S. aureus* sowie ihrer zytotoxischen Wirkung gegenüber Säugetierzellen zu untersuchen. Darüberhinaus spielt die Resistenzentwicklung eine wichtige Rolle, weshalb *S. aureus* ebenfalls auf die Ausprägung von Resistenzen unter dem Einfluss der Stigmate analysiert wurde.

Die Untersuchung des bakteriellen Wachstums ergab, dass die Stigmate den *S. aureus* Laborstamm NCTC 8325 und ein klinisches MRSA-Isolat im gleichen Maße inhibierten und die Wirkung auf einem bakteriziden Mechanismus beruhte. Die Beurteilung der Zytotoxizität der Stigmate zeigte allerdings, dass Säugetierzellen in dem gleichen Konzentrationsbereich geschädigt wurden, in dem auch die antibakterielle Wirkung auf *S. aureus* einsetzte.

Die im Boden lebenden Myxobakterien verwenden Sekundärmetabolite unter anderem zur chemischen Abwehr von konkurrierenden Mikroorganismen (Weissmann und Müller, 2009). Daher ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass andere Bakterienspezies, die diesen antibakteriellen Verbindungen ausgesetzt waren, zum Überleben einen Resistenzmechanismus ausgebildet haben. Die dafür notwendigen Resistenzgene sind meistens auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert, welche durch Gentransfer auf andere Bakterien übertragen werden können. Es gibt Hinweise, dass diese Strategie unter anderem bei Streptomyceten, Enterokokken und Staphylokokken auftritt. Dies liefert eine Hypothese,

auf welche Weise *S. aureus* Resistenzgene gegen Methicillin, Tetrazyklin und Vancomycin erlangt hat (Witte, 2004; Weigel *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2002; Benveniste und Davies, 1973).

Bei der Untersuchung der Resistenzentwicklung konnte bereits bei der zweiten Kultivierung eine Resistenz von *S. aureus* sowohl gegen Stigmareson 7 als auch gegen Stigmachronon 8 festgestellt werden. Dies zeigte sich durch das frühere Einsetzen des bakteriellen Wachstums bei den gleichen subinhibitorischen Wirkstoffkonzentrationen. Das Auftreten dieser Resistenz kann zwei Ursachen haben. Zum einen kann die Resistenz neu entstanden sein, indem aufgrund von Wirkstoff-bedingtem Selektionsdruck ein oder mehrere Bakterien durch die Ausprägung einer neuen Mutation überlebten. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass umgehend nach Zugabe des Wirkstoffes ein bereits in *S. aureus* vorhandener Resistenzmechanismus aktiviert wurde.

Diese Analysen zeigten, dass wegen der starken zytotoxischen Wirkung und dem schnellen Auftreten von Resistenzen die Stigmate nicht als Kandidaten für ein Antibiotikum in Frage kommen. Für den Fall, dass die Wirkung der Stigmate auf einem neuen Wirkmechanismus beruht, besteht jedoch die Möglichkeit, durch chemische Modifizierungen die Struktur der Stigmate dahingehend zu verändern, dass deren Zytotoxizität erheblich reduziert wird.

Die Stigmate wurden bei der Suche nach antibakteriellen Wirkstoffen innerhalb eines phänotyp-basierten Hochdurchsatzverfahrens gefunden und weisen eine bislang unbekannte Grundstruktur auf. Daher war es ein weiteres Ziel in dieser Arbeit, den Wirkmechanismus und die Zielstruktur der Stigmate zu untersuchen.

Die chemischen Strukturen von Stigmareson 7 und 19 sowie Stigmachronon 6 und 8 sind ähnlich. Es handelt sich um Aromaten, die außer einer gesättigten Kohlenstoffkette auch eine Nitro-Gruppe aufweisen. Daher wurde erwartet, dass sich die Verbindungen in ihren Wirkungen nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Im direkten Vergleich der vier Wirkstoffe traf dies sowohl auf die antibakterielle als auch auf die zytotoxische Wirkung zu, welches sich in nahezu identischen MIC-Werten äußerte. Diese Fakten lassen vermuten, dass die vier Stigmate in demselben Organismus einen identischen Wirkmechanismus und auch die gleiche Zielstruktur besitzen. Jedoch könnte die Interaktion der Stigmate mit der Zielstruktur unspezifisch sein, da die strukturellen Unterschiede der Stigmate offensichtlich keine wesentlichen Auswirkungen auf diese Interaktion hatten. Des Weiteren wäre es denkbar, dass die Stigmate in *S. aureus* andere Wirkmechanismen und Targets aufweisen als in Säugetierzellen.

Zunächst wurde der Überlegung nachgegangen, inwiefern die negativ geladene Nitro-Gruppe der Stigmate an deren antimikrobieller und zytotoxischer Wirkung beteiligt sein könnte. Die Substitution der Nitro-Gruppe von Stigmachronon 8 durch eine Acetyl-Gruppe zeigte, dass das Acetyl-Derivat keine toxische oder inhibierende Wirkung aufwies. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Nitro-Gruppe die biologische Aktivität der Verbindung gegenüber *S. aureus* und auch den tierischen Zellen vermittelt. Durch die neutrale Acetyl-Gruppe erhielt die Verbindung einen stärkeren unpolaren Charakter. Aufgrund der lipophilen Kohlenstoffkette der Stigmate ist anzunehmen, dass die Aufnahme in die Zelle nicht durch eine Pore, sondern vielmehr durch passive Diffusion durch die Lipidmembran abläuft (Camenisch *et al.*, 1996). Daher sollte die Acetyl-Gruppe die Lipophilität der Stigmate noch verstärken. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Verlust der biologischen Aktivität nicht auf einer Verminderung der Permeabilität, sondern auf der fehlenden Interaktion mit der Zielstruktur beruht.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus kann ein Vergleich der antibakteriellen Wirkung der Stigmate mit dem  $\beta$ -Laktam Antibiotikum Methicillin auf einen methicillin-resistenten Stamm Aufschluss darüber geben, ob die Stigmate mit der gleichen Zielstruktur wie Methicillin interagieren. Methicillin-resistente Stämme exprimieren PBP2a, welches als Enzym anstelle von PBP in der Zellwandsynthese von *S. aureus* agiert. Im Gegensatz zu den PBPs besitzt PBP2a eine andere Struktur, an die Methicillin nicht binden kann (Kuroda *et al.*, 2001). Daher wurde untersucht, ob die Stigmate ebenso wie Methicillin die PBP Proteine als Zielstruktur besitzen. Eine Analyse mit dem klinischen MRSA-Isolat zeigte, dass die Stigmate eine Wachstumsinhibierung hervorriefen, wohingegen Methicillin keinen Einfluss auf das Wachstum hatte. Dies beweist, dass das klinische MRSA-Isolat resistent gegen Methicillin und nicht resistent gegen die Stigmate war. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die PBPs nicht das Target der Stigmate darstellen.

Für einen spezifischeren Einblick in die zytotoxische Wirkung der Stigmate wurde des Weiteren das MMP der A549 Zelllinie untersucht. Dabei zeigte sich, dass das MMP der Zellen unter dem Einfluss der Stigmate depolarisiert wurde. Am Beispiel von Stigmachronon 8 wurde nachgewiesen, dass sich die Reduktion des MMPs durch Stigmachronon 8 zwar mit steigender Konzentration verstärkte, dass jedoch das Ausmaß der Depolarisierung in einem Zeitraum von bis zu 24 h zeitunabhängig war. Da auch bei höheren Stigmatkonzentrationen immer noch eine geringe Polarität des MMP zu beobachten war, sollte geklärt werden, ob diese Zellen noch lebten oder bereits apoptotisch waren. Dazu wurde nach der Behandlung der Wirkstoff von den Zellen entfernt und nach einer 30 minütigen Erholungsphase das MMP

bestimmt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass der Effekt von Stigmachronon 8 bzw. Stigmareson 7 auf das MMP der A549 Zelllinie reversibel war, da das MMP nach Entfernung des Wirkstoffes wieder anstieg.

Jedoch war die Wirkung der Stigmaten auf verschiedene Zelllinien unterschiedlich. Außer der humanen A549 Lungenepithelzelllinie wurde auch die murine L929 Fibroblastenzelllinie untersucht. Während das MMP der A549 Zelllinie durch den Einfluss von Stigmachronon 8 beeinträchtigt wurde, wurde das MMP der L929 Zelllinie kaum depolarisiert. Aufgrund der vergleichbar starken Zytotoxizität beider Zelllinien im MTT Test, war dieses Ergebnis unerwartet.

Die A549 Zellen sind immortalisierte Tumorzellen und können daher anders auf die Zugabe von Wirkstoffen reagieren als primäre Zellen, da sie teilweise ihre ursprünglichen Eigenschaften verloren haben. Da primäre Zellen besser die *in vivo* Situation simulieren, wurde sowohl die Zytotoxizität als auch die Wirkung der Stigmaten auf das MMP der HUVEC Zellen untersucht. Im MTT Test zeigte sich, dass die HUVEC Zellen wesentlich empfindlicher auf die Stigmaten reagierten als die beiden Zelllinien. Das MMP der HUVEC Zellen war durch Stigmachronon 8 ebenso depolarisiert wie bei den A549 Zellen. Dennoch konnte der reversible Effekt von Stigmachronon 8 auf das MMP der A549 Zelllinie bei den HUVEC Zellen nicht beobachtet werden. Dies deutet an, dass der reversible Effekt von Stigmachronon 8 bzw. Stigmareson 7 auf das MMP auf zellspezifischen Eigenschaften der A549 Zellen basiert.

Möglicherweise beruht die unterschiedliche Wirkung der Stigmaten auf die Säugetierzellen auf einem variierenden Repertoire an Schutzmechanismen, welche den Zellen das Überleben sichern sollen. Beispielsweise verfügen tierische Zellen über eine Vielzahl an sogenannten Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen, die durch eine Biotransformation entweder eine Detoxifizierung oder eine Aktivierung der Verbindungen zu reaktiven karzinogenen Intermediaten bewirken. Als Xenobiotika werden zellfremde Stoffe bezeichnet, die von Zellen aufgenommen werden. Ein Beispiel hierfür sind Schadstoffe, wie die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die bei der unvollständigen Verbrennung von organischem Material entstehen (Castell *et al.*, 2005). Aber auch Medikamente sind Xenobiotika, die über die Nieren vom Körper wieder ausgeschieden werden, um eine Anreicherung im Gewebe zu verhindern (Launay-Vacher *et al.*, 2006). Zu den Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen gehören unter anderem die Cytochrom P450-Enzyme (CYP), Glutathiontransferasen, Sulfotransferasen, NAD(P)H Quinon-Oxidoreduktasen und Aldo-Ketoreduktasen. Diese Enzyme modifizieren die zellfremden Verbindungen zu polarerer und hydrophileren

Metaboliten, welches die Exkretion der Verbindungen erleichtert. Während der Transformation wird im ersten Schritt enzymatisch über eine Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse eine funktionelle Gruppe am Xenobiotikum exponiert oder neu angefügt (Holcapek *et al.*, 2008). Daraufhin wird im zweiten Schritt ein hydrophiles Molekül an diese funktionelle Gruppe angelagert (Holcapek *et al.*, 2008). Die Xenobiotika erhalten durch das hydrophile Konjugat einen insgesamt hydrophileren Charakter und können mithilfe von Transporterproteinen unter ATP-Verbrauch aus der Zelle ausgeschleust werden (Wang *et al.*, 2011; Srivalli und Lakshmi, 2012).

Ein Beispiel für diese Transporter sind die Phospho-Glykoproteine (P-Glykoproteine), die zur Familie der ABC (ATP-Binding Cassette) Transporter gehören und als Efflux-Proteine in der Membran lokalisiert sind. Diese Proteine werden in Krebszellen überexprimiert, wodurch einige Chemotherapeutika kaum ihre Wirkung in diesen Zellen entfalten können, da sie umgehend wieder exkretiert werden. Außerdem kommen die P-Glykoproteine besonders häufig in Epithelzellen vor, die durch die Exkretion toxischer Stoffe die Organe schützen. P-Glykoproteine können ein breites Spektrum an strukturell unterschiedlichen und insbesondere hydrophoben Verbindungen aus der Zelle ausschleusen (Amin, 2013).

Sowohl die A549 Zellen als auch die L929 Zellen sind in der Lage, das P-Glykoprotein zu exprimieren (Xia *et al.*, 2005; Kralli und Yamamoto, 1996; Pariente, 2008). Im Gegensatz dazu weisen die HUVEC Zellen kein P-Glykoprotein auf, besitzen dafür aber vermutlich andere ABC-Transporterproteine (Huang *et al.*, 2013; Iwahana *et al.*, 1998).

Der beobachtete reversible Effekt der Stigmate auf die A549 Zellen kann darauf beruhen, dass die A549 Zellen aufgrund ihrer Eigenschaft als karzinogene Epithelzellen das P-Glykoprotein verstärkt exprimieren und daher in der Lage sind, die Stigmate im größeren Umfang aus der Zelle auszuschleusen als andere Zelltypen. Da nach dem Entfernen der Stigmate der Wirkstoffgradient von innen nach außen größer ist, können die A549 Zellen vermutlich die intrazellulären Moleküle effizienter aus der Zelle ausschleusen, da weniger neue Moleküle über die Membran in die Zelle diffundieren. Dagegen könnten die HUVEC Zellen eine geringere Menge an Efflux-Transportern besitzen, die die Stigmate weniger wirksam exkretieren. Somit könnte der aufgenommene Wirkstoff auch nach dem Entfernen der extrazellulären Moleküle verstärkt in den HUVEC Zellen verbleiben und daher eine höhere Toxizität besitzen.

Zu den Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen gehören auch die Glutathion-S-Transferasen, die sowohl in Säugetieren als auch in Bakterien vorkommen (Wang *et al.*, 2011; Park *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2009; Rigsby *et al.*, 2005). Diese Enzyme katalysieren im

zweiten Schritt der Biotransformation die Bindung von Glutathion an die toxischen Verbindungen (Wang *et al.*, 2011). Durch die Anlagerung des Glutathions kann es zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) kommen, wenn das Xenobiotikum z.B. eine Nitro-Gruppe aufweist (Chakrapani *et al.*, 2008).

NO besitzt verschiedene Auswirkungen auf die tierische Zelle und kann ab einer bestimmten Menge die Apoptose auslösen. Ebenso führt eine langfristige Überproduktion von NO zur Aktivierung von pro-apoptotischen Faktoren (Choi *et al.*, 2002). Innerhalb der Atmungskette inhibiert NO reversibel den Sauerstoffverbrauch, indem es kompetitiv mit Sauerstoff an Cytochrom aa<sub>3</sub> von Komplex IV bindet, wodurch die Synthese von ATP gehemmt wird (Cassina und Radi, 1996; Poderoso *et al.*, 1996; Moncada und Bolaños, 2006). Bei der Bindung von NO an Komplex IV wird ein Elektron an molekularen Sauerstoff weitergegeben, wodurch Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und damit oxidativer Stress entsteht.

Sowohl die in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen A549, L929 und HUVEC Zellen als auch *S. aureus* weisen Glutathion-S-Transferasen auf (Wang *et al.*, 2011; Park *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2009; Rigsby *et al.*, 2005). Es gibt verschiedene Isoformen von Glutathion-S-Transferasen und diese können aufgrund einer relativ geringen Substratspezifität mit einem breiten Spektrum an toxischen Substanzen interagieren (Wang *et al.*, 2011). Daher besteht die Möglichkeit, dass es aufgrund einer Reaktion zwischen der Glutathion-S-Transferase und den Stigmaten zu einer Abspaltung von NO kommen könnte. Zwar würden die Stigmat-Glutathion Konjugate von der Zellen exkretiert werden, aber dennoch könnten die reaktiven NO-Moleküle eine reversible oder sogar irreversible Schädigung der Zelle hervorrufen. Somit könnte die Zellatmung inhibiert und letztendlich auch die Apoptose der Zellen ausgelöst werden, welches sich in einem reduzierten MMP und in einer starken Zytotoxizität äußert. Dies wäre eine denkbare Hypothese zum Wirkmechanismus der Stigmate in Säugetierzellen. Aber nicht nur das MMP der tierischen Zellen war von der Wirkung der Stigmate betroffen, sondern es zeigten sich auch Effekte auf den Zellzyklus. Aufgrund des Ergebnisses vom MTT Test, welcher einen Einfluss der Stigmate auf die Zellteilung andeutete, wurde zunächst der Zellzyklus der A549 Zellen genauer untersucht. Durch die Zugabe von Stigmachronon 8 bzw. Stigmareson 7 war eine deutliche Verlangsamung der DNA-Syntheserate zu beobachten und auch die übrigen Zellzyklusphasen wurden von den Zellen mit reduzierter Geschwindigkeit durchlaufen. Dieses Ergebnis liefert den Hinweis, dass die Stigmate kurzfristig eine Verlangsamung, aber keinesfalls eine Arretierung des Zellzyklus der A549 Zellen bewirken. Der Zellzyklusarrest ist ein essentieller Schutzmechanismus der Zelle, um entweder entstandene Schäden vor der nächsten Mitose zu reparieren oder bei irreparablen Schäden die

Apoptose einzuleiten (Vermeulen *et al.*, 2003). Daher schienen die Stigmate die A549 Zellen bei einer Kurzzeit-Behandlung nicht so stark zu schädigen, dass ein Stillstand des Zellzyklus ausgelöst wurde. Diese Annahme wird von der reversiblen Wirkung auf das MMP der A549 Zellen noch zusätzlich unterstützt. Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei dieser Zelllinie um Tumorzellen handelt, welche unter Umständen aufgrund von außer Kraft gesetzten Apoptose-Faktoren anders auf toxische Substanzen reagieren als primäre Zellen (Devereux *et al.*, 1999).

Ebenso wie die Stigmate weist auch der polyphenolische Wirkstoff Resveratrol die Eigenschaft auf, eine reversible Verzögerung der S-Phase hervorzurufen (Zhou *et al.*, 2009). Dieser Wirkstoff ist bei Zugabe von pharmakologisch wirksamen Konzentrationen sowohl auf Krebszellen als auch auf nicht-maligne Zelllinien nicht zytotoxisch. Dadurch besteht der Ansatzpunkt, diesen Wirkstoff zur Krebsprävention und zur Lebensverlängerung von Zellen einzusetzen, da die Zeitspanne zur Reparatur von DNA Schäden verlängert wird (Zhou *et al.*, 2009). Daher wurde im Folgenden analysiert, ob die Stigmate ebenfalls eine Verzögerung im Zellzyklus der primären HUVEC Zellen auslösten. Es wurde vermutet, dass aufgrund der höheren Toxizität im MTT Test die Stigmate einen erheblich stärkeren Einfluss auf den HUVEC Zellzyklus als auf den A549 Zellzyklus ausüben würden. In Anbetracht des verlangsamten Zellzyklus der A549 Zellen wäre auch ein Zellzyklusarrest der HUVEC Zellen denkbar. Die Untersuchung zeigte jedoch entgegen der Erwartung, dass der Zellzyklus der primären HUVEC Zellen durch den Einfluss der Stigmate weder verlangsamt noch arretiert wurde.

Mit der Analyse des Zellzyklus zeigte sich wiederum, dass die Zellen unterschiedlich auf die Stigmate reagierten. Möglicherweise besitzen die Säugetierzellen außer der Glutathion-S-Transferase noch weitere zelltypspezifische Enzyme, welche die Stigmate auf verschiedene Weise metabolisieren. Zum Beispiel gibt es eine große Anzahl verschiedener Cytochrom P450 (CYP) Enzyme, die ebenfalls eine Rolle beim Metabolismus von Xenobiotika spielen. Die CYPs sind Oxidoreduktasen mit einer Häm-Domäne, die im ersten Schritt der Biotransformation durch eine Oxidation oder Reduktion eine funktionelle Gruppe anfügen oder zugänglich machen (Shimada, 2006; Elsherbiny und Brocks, 2011). Während der Metabolisierung können aus den Xenobiotika reaktive Intermediate entstehen, die aufgrund ihrer Zytotoxizität die Zelle schädigen können (Shimada, 2006). Somit können aufgrund der Modifizierung durch die CYPs reaktive Intermediate als DNA-Addukte fungieren und eine karzinogene Wirkung entfalten. Dabei binden die Intermediate kovalent an die DNA, wodurch diese beschädigt wird. Ist die DNA so stark geschädigt, dass sie nicht mehr repariert

werden kann, wird durch Einstellen der DNA-Synthese die Zellteilung inhibiert und Apoptose induziert (Khan *et al.*, 1998).

Sowohl die primären HUVEC Zellen als auch die A549 und L929 Zelllinien besitzen CYPs, die in jedem Zelltyp in einer anderen Zusammensetzung und in unterschiedlichen Mengen vorliegen (Dauchy *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2000; Gut *et al.*, 2000). Es ist zu vermuten, dass die unterschiedliche Wirkung der Stigmate auf das MMP und den Zellzyklus auf das zellspezifische Repertoire von jedem Zelltyp zurückzuführen ist, Xenobiotika zu metabolisieren. Dann basieren die beobachteten Wirkungen der Stigmate möglicherweise nicht primär auf einer spezifischen Interaktion mit einer bestimmten Zielstruktur, sondern auf der Entstehung unterschiedlicher reaktiver Intermediate, die auf vielfältige Weise die Zelle schädigen.

Die Regulierung des Zellzyklus ist jedoch auch von weiteren Faktoren abhängig. Unter anderem besitzt die Aktivität der an der Mevalonat-Biosynthese beteiligten HMG-CoA Reduktase einen Einfluss auf die DNA Synthese im tierischen Zellzyklus und somit auch auf die Zellteilung (Abb. 4.1; Quesney-Huneus *et al.*, 1979; Chen, 1983). Das Endprodukt des Mevalonat-Syntheseweges sind die Isoprenoide, die in Form von Farnesyl- und Geranylgeraniol-Molekülen zur posttranslationalen Modifizierung von Proteinen genutzt werden. So können die kleinen GTPasen der RAS (Rat sarcoma)-Superfamilie erst durch Konjugation an die Isoprenoide kovalent an die Zellmembran binden (Fehrenbacher *et al.*, 2009). Daraufhin aktivieren die GTPasen den entsprechenden MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Signalweg, welcher über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation und den Beginn des Zellzyklus auslöst (Konstantinopoulos *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2003). Daher bestimmt die Menge an synthetisierten Isoprenoiden, wie viele GTPasen modifiziert werden und ob es zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges kommt (Pratilas und Solit, 2010). Außer für die posttranslationale Modifizierung von Proteinen werden die Isoprenoide auch zur Synthese von Cholesterin benötigt. Da Cholesterin ein Bestandteil der tierischen Zellmembran ist, spielt auch die Verfügbarkeit von Cholesterin eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation (Goldstein und Brown, 1990). Ein weiterer Faktor bei der Regulierung des Zellzyklus ist die AMPK, die als metabolischer Sensor in eukaryotischen Zellen fungiert und ebenfalls einen Arrest des Zellzyklus induzieren kann (Abb. 4.1; Curtis und Kim, 1973; Hardie *et al.*, 1998; Igata *et al.*, 2005). Jede Säugetierzelle besitzt ein AMPK System, welches abhängig vom ATP-Gehalt eine Vielzahl metabolischer Prozesse reguliert und dadurch die negativen Auswirkungen von ernährungs- oder umweltbedingten Stress verringert (Hardie und Carling, 1997).



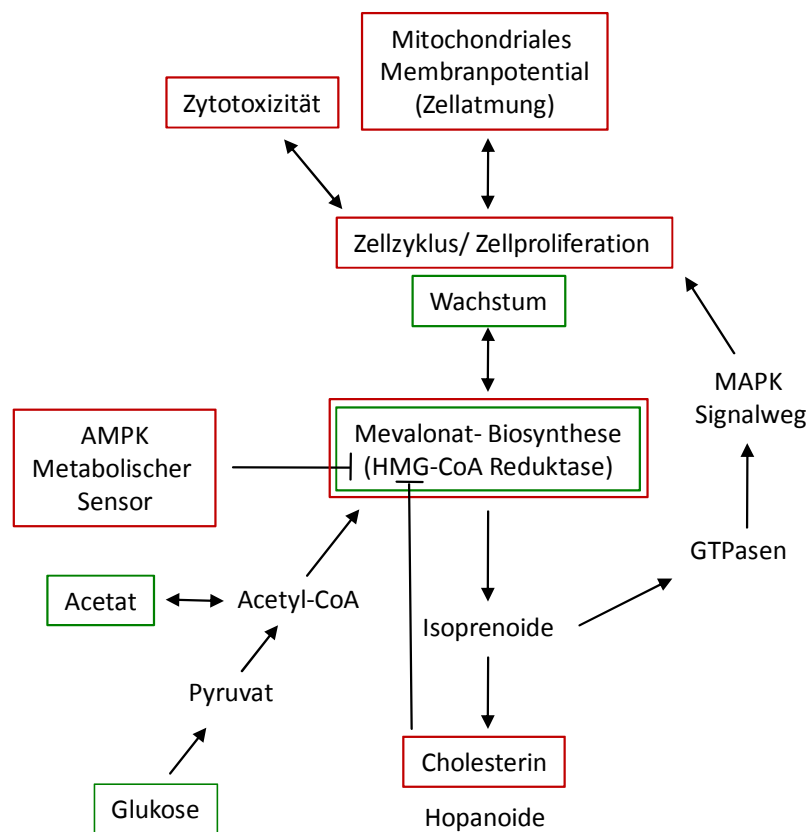


Abb. 4.1: Zusammenhänge zwischen den analysierten Stoffwechsel- und Biosynthesewegen und deren Produkte in Säugetierzellen und *S. aureus*. Die untersuchten Faktoren von *S. aureus* sind grün und die untersuchten Faktoren der Säugetierzellen sind rot hervorgehoben.

Da die aktivierte AMPK metabolisch relevante Enzyme inhibiert, wie z.B. die HMG-CoA Reduktase, wird infolgedessen auch die Cholesterinsynthese als ATP-verbrauchender Prozess beeinflusst (Carling *et al.*, 1987; Carling *et al.*, 1989; Clarke und Hardie, 1990; Sato *et al.*, 1993).

Beispielsweise könnten Substanzen die AMPK phosphorylieren, welches zu einer Hemmung des Mevalonat-Syntheseweges und einer verminderten Produktion von Cholesterin führen würde (Abb. 4.1). So beschrieben Qiu *et al.* einen neuen polyzyklischen Wirkstoff, welcher in einem Wirkstoff-Screening nach neuen Regulatoren des MMPs gefunden wurde und eine Depolarisierung des MMPs von L6-Myotuben bewirkt. In anschließenden Experimenten wurde festgestellt, dass diese Verbindung als Aktivator der AMPK fungiert und eine Abnahme des Cholesteringehalts in HepG2 Zellen induziert (Qiu *et al.*, 2010).

Da eine Wirkung der Stigmate auf das MMP und den Zellzyklus der A549 Zellen festgestellt werden konnte, wurde ein Zusammenhang mit der Regulierung des Mevalonat-Syntheseweges vermutet. Die Stigmate könnten entweder durch eine direkte Inhibierung der HMG-CoA oder durch eine indirekte Hemmung der HMG-CoA über den Phosphorylierungszustand der AMPK eine Wirkung auf die Zellen ausüben. Unabhängig

davon, um welche Art der Inhibierung es sich handelt, sollte auf jeden Fall durch die Behandlung mit Stigmaten eine Veränderung im Cholesteringehalt der Zellen auftreten. Die Untersuchung ergab indessen ganz entgegen der Hypothese einen Anstieg des Cholesteringehalts der A549 Zellen. Dieses Ergebnis kann momentan nicht erklärt werden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Stigmate so wie auch der cholesterin-senkende Wirkstoff Simvastatin die HMG-CoA Reduktase als Zielstruktur haben und über den gleichen Wirkmechanismus agieren. Die A549 Zellen schienen zur Untersuchung dieser Hypothese geeignet, da die HMG-CoA Reduktase aufgrund einer Deregulation verstärkt in ihrer aktiven Form vorliegt, welches zu einer vermehrten Synthese von Isoprenoiden führt (Bennis *et al.*, 1993). Vermutlich fördert eine erhöhte Produktion von Mevalonat das Wachstum von Tumorzellen, indem eine höhere Zellteilungsrate ermöglicht wird (Duncan *et al.*, 2004). Daher sollte eine Inhibierung dieses Enzyms durch Simvastatin eindeutig nachweisbar sein. Anhand des MMPs wurde gezeigt, dass Simvastatin einen irreversiblen Effekt auf das MMP hatte. Dieses Ergebnis ist konträr zur reversiblen Wirkung der Stigmate auf die A549 Zellen. Dies lässt vermuten, dass Simvastatin permanent an die HMG-CoA Reduktase gebunden hat, wohingegen die Interaktion der Stigmate mit dem Target transient zu sein scheint. Auch wenn sich daraus nicht ergibt, ob die HMG-CoA die Zielstruktur der Stigmate ist, kann jedoch aus dem Ergebnis abgeleitet werden, dass der Wirkmechanismus von Simvastatin nicht mit dem Wirkmechanismus der Stigmate identisch ist.

Da die Analyse der Stigmat-Wirkung auf die HMG-CoA Reduktase der Säugetierzellen zu keinem Ergebnis führte, wurde alternativ der Mevalonat-Syntheseweg in *S. aureus* weiter untersucht. Die Generierung der Isoprenoide läuft in gram-positiven Kokken ebenfalls über den Mevalonat Syntheseweg ab (Wilding *et al.*, 2000a). Anstelle von Cholesterin synthetisiert die Mehrzahl der Bakterien aus den Isoprenoiden Hopanoide, die der bakteriellen Zellmembran Stabilität verleihen (Kannenbergs und Poralla, 1999). Es wird angenommen, dass der Mevalonat Syntheseweg in allen Lebewesen gleich aufgebaut ist, jedoch wurden bei Sequenzanalysen zwei Klassen von HMG-CoA Reduktasen gefunden. Tiere, Pflanzen, Pilze und Archae-Bakterien besitzen die Klasse I HMG-CoA Reduktase und manche Eubakterien, wie *S. aureus*, die Klasse II HMG-CoA Reduktase. Zurzeit ist allerdings nicht bekannt, inwiefern sich die Reduktasen voneinander unterscheiden (Bochar *et al.*, 1999; Wilding *et al.*, 2000b). Möglicherweise besitzen die Klasse II HMG-CoA Reduktasen eine andere Struktur als die HMG-CoA Reduktase der A549 Zellen, die eine Interaktion mit den Stigmaten ermöglicht.

Anhand von *S. aureus* Mutanten des Mevalonat-Syntheseweges wurde bereits von Balibar *et al.* gezeigt, dass eine Inhibierung der Isoprenoid-Produktion sich erheblich auf die Zellwand-Biosynthese auswirkt und zu einer Reduktion der bakteriellen Wachstumsrate führt. Diese Inhibierung konnte durch die Zugabe von exogenem Mevalonat kompensiert werden (Balibar *et al.*, 2009).

Da die HMG-CoA Reduktase HMG-CoA zu Mevalonat umsetzt, bewirkt die Inhibierung der Reduktase durch Simvastatin, dass Mevalonat nicht mehr gebildet werden kann. Zunächst konnte daher diese Hypothese bestätigt werden, da die Inhibierung der *S. aureus* HMG-CoA Reduktase durch eine Behandlung mit Simvastatin eine Wachstumsreduktion zur Folge hatte. Des Weiteren wurde durch die Zugabe von exogenem Mevalonat diese Inhibierung erwartungsgemäß kompensiert. Dagegen hatte die Zugabe von Acetyl-CoA, dem Ausgangsstoff im Mevalonat-Syntheseweg, keine Auswirkung auf die Wachstumsreduktion. Überraschenderweise wurde die Stigmat-induzierte Wachstumsinhibierung von *S. aureus* sowohl durch die Zugabe von exogenem Mevalonat als auch von Acetyl-CoA kompensiert. Dies ist ungewöhnlich, da zwar allem Anschein nach der Mevalonat-Syntheseweg nicht durch die Stigmate beeinflusst wird, aber dennoch durch die Zugabe von Mevalonat oder Acetyl-CoA die Wachstumsreduktion aufgehoben wurde. Zurzeit ist dieser Effekt nicht erklärbar. Dennoch kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der HMG-CoA Reduktase um das Target der Stigmate handelt und darüberhinaus ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass die Stigmate den Mevalonat Syntheseweg direkt beeinflussen.

Wenn die Wirkung der Stigmate auf den Mevalonat-Syntheseweg nicht auf direkte Weise erfolgt, besteht anstatt dessen die Möglichkeit, dass es sich um einen indirekten Effekt handelt, der durch eine Interaktion der Stigmate mit der AMPK hervorgerufen wird. Daher wurde die Hypothese überprüft, ob die Stigmate eine Wirkung auf die AMPK besitzen, indem sie deren Phosphorylierungszustand und damit die Aktivität beeinflussen. Da Bakterien im Gegensatz zu den Säugetierzellen kein AMPK-System zur Regulierung verschiedener Stoffwechselwege besitzen, wurden die tierischen A549 Zellen zur Analyse eingesetzt. Anhand der Untersuchung des Phosphorylierungszustandes der AMPK konnte keine Regulierung der AMPK-Aktivität unter dem Einfluss von Stigmareson 7 bzw. Stigmachronon 8 beobachtet werden. Allerdings war der basale Phosphorylierungszustand der AMPK sehr niedrig, so dass möglicherweise eine Inhibierung der AMPK Phosphorylierung nicht detektierbar war. Außerdem könnten nicht optimal geeignete Zeitpunkte gewählt worden sein. Demnach kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die Stigmate an der Regulierung des Phosphorylierungszustandes der AMPK beteiligt sind.

Zur Synthese von Isoprenoiden über den Mevalonat-Biosyntheseweg wird sowohl in Bakterien als auch in Säugetierzellen Acetyl-CoA als Ausgangsstoff benötigt (Abb. 4.1). In der Glykolyse wird durch die Metabolisierung von Glukose Pyruvat gebildet, das in der darauf folgenden oxidativen Decarboxylierung das Ausgangsprodukt zur Bildung von Acetyl-CoA darstellt. Des Weiteren reichert *S. aureus* Acetat im Medienüberstand an, welches bei Glukosemangel als Energiereserve dient, indem es von den Zellen wieder aufgenommen und weiter verstoffwechselt wird (Gardner und Lascelles, 1962). Da für *S. aureus* keine Inhibierung der HMG-CoA Reduktase nachgewiesen wurde, war möglicherweise ein Schritt in der Glykolyse betroffen, wodurch die Bereitstellung von Acetyl-CoA als auch die Produktion von Acetat eingeschränkt oder vollständig inhibiert werden könnte. Der Versuch zeigte jedoch, dass sowohl die Synthese von Acetat als auch der Verbrauch von Glukose verglichen mit der Kontrolle zwar verzögert einsetzten, aber dennoch im gleichen Maß ablaufen konnten. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Stigmate keinen Zwischenschritt der Glykolyse inhibierten.

Die Analyse des Mevalonat-Syntheseweges als auch der Glykolyse führte zu keinem aussagekräftigen Ergebnis bezüglich der Zielstruktur oder des Wirkmechanismus der Stigmate. Daher wurde in einem vorwärtsgerichteten genetischen Ansatz ein gegen Stigmachronon 8 resistenter *S. aureus* Stamm hergestellt, dessen Genom auf Mutationen untersucht wurde, die unter dem Einfluss von Stigmachronon 8 entstanden waren. Das Experiment begründet sich auf der Hypothese, dass die Entstehung von Resistenzen häufig auf dem Austausch von Nukleotiden in dem DNA-Bereich basieren, der höchstwahrscheinlich das Target eines Antibiotikums ist. Eine derartige Mutation bewirkt häufig eine veränderte Bindungsstelle des Targetproteins, wodurch die Interaktion mit dem Wirkstoff verhindert wird (Ho *et al.*, 2011).

Im Genom des generierten resistenten *S. aureus* Stammes wurde eine Punktmutation in dem hypothetischen Protein SAOUHSC\_02659 nachgewiesen. Eine Datenbankanalyse ergab zwei mögliche Proteine, die die gleiche konservierte Domäne aufweisen. Bei dem einen Protein handelt es sich möglicherweise um einen Transkriptionsregulator in Form eines Repressors aus der TetR (Tetrazyklin Repressor)-Familie, welcher eine Sequenzähnlichkeit zu einer HTH *tetR*-typ DNA-bindenden Domäne aufweist. Neben dem transkriptionellen TetA-TetR Regulationsmechanismus in *E. coli*, der die Resistenz gegen Tetrazyklin über eine Effluxpumpen-basierte Ausschleusung erlangt, ist ein vergleichbares System mit den Proteinen QacA/B in *S. aureus* bekannt, die den MFS (Major Facilitator Superfamily)-Transportern angehören (Hassan *et al.*, 2007). Auch hier werden mithilfe eines Multidrug

Efflux-Systems über die QacA/B Pumpe aktiv verschiedene Antibiotika aus der Zelle hinaus transportiert. So wird die Expression des QacA/B Proteins mithilfe des QacR Transkriptionsregulators gesteuert, indem dieser durch Interaktion mit verschiedenen Wirkstoffen nicht mehr an die QacA/B Operator-Sequenz bindet (Grkovic *et al.*, 1998; Brown und Skurray, 2001). Sowohl TetR als auch QacR gehören der gleichen Familie von TetR Transkriptionsregulatoren an, die alle eine konservierte N-terminale multi-helikale DNA-Bindungsdomäne besitzen (Hassan *et al.*, 2007). Dagegen weisen die übrigen Domänen von QacR und TetR, mit denen auch die Bindung an verschiedene Wirkstoffe erfolgt, keine Ähnlichkeit auf (Brown und Skurray, 2001). Da es sich bei SAOUHSC\_02659 lediglich um ein hypothetisches Protein handelt, ist nur zu mutmaßen, dass es die Expression eines Effluxproteins auf transkriptioneller Ebene reguliert. Einen Hinweis darauf liefert die Tatsache, dass *S. aureus* bei der Behandlung mit Stigmaten oder Tetrazyklin ein verzögertes Wachstum zeigte. Somit könnte die zeitliche Verzögerung auf eine vorherige Expression eines Effluxproteins zurückgeführt werden, welches durch die Ausschleusung des Wirkstoffes den Bakterien ein verzögertes Wachstum ermöglicht. Daher kann vermutet werden, dass *S. aureus* auf die Zugabe von Stigmachronon 8 mit der gleichen Überlebensstrategie reagiert wie auf die Zugabe von Tetrazyklin. Möglicherweise war die induzierte Mutation im putativen Repressor der TetR-Familie eine Modifikation, die aufgrund der chemischen Struktur von Stigmachronon 8 entstanden war. Eine damit verbundene höhere Bindungsaffinität zwischen Stigmachronon 8 und dem putativen Repressor könnte zu einer optimierten Ausschleusung des Wirkstoffes aus der Zelle führen.

In der Annahme, dass diese Hypothese zum möglichen Resistenzmechanismus von *S. aureus* gegen Stigmachronon 8 zutrifft, gibt dies dennoch keinen weiteren Aufschluss darüber, welches die Zielstruktur von Stigmachronon 8 in *S. aureus* ist. Wenn sowohl Tetrazyklin als auch Stigmachronon 8 über den gleichen Resistenzmechanismus von *S. aureus* und eventuell sogar mithilfe der gleichen Proteine exkretiert werden, bedeutet dies dennoch nicht, dass Stigmachronon 8 so wie Tetrazyklin die 30S-ribosomale Untereinheit als Target hat und die Proteinbiosynthese inhibiert (Suarez und Nathans, 1965; Semenkov *et al.*, 1982; Goldman *et al.*, 1983; Chopra *et al.*, 1992).

Zum anderen ergab die Datenbankanalyse, dass es sich bei dem hypothetischen Protein SAOUHSC\_02659 um einen DHAK (Dihydroxyacetonkinase)-Regulator mit einer regulatorischen Domäne (TIGR02366) handeln könnte. Die DHAK hat die Funktion, unter ATP-Verbrauch Dihydroxyaceton zu Dihydroxyacetonphosphat umzuwandeln. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle beim bakteriellen Abbau von Fettsäuren. Hier entsteht in

einem Zwischenschritt Glycerin, welches zunächst von der Glycerindehydrogenase zu Dihydroxyaceton umgesetzt wird. Die folgende Phosphorylierung durch die DHAK ist notwendig, um über die Triosephosphat-Isomerase Glyceraldehyd-3-phosphat herzustellen. In dieser Form wird Glyceraldehyd-3-phosphat in der Glykolyse weiter verstoffwechselt.

In gram-positiven Bakterien besitzt der putative Regulator der DHAK aufgrund einer TetR Transkriptionsregulator-Domäne eine mögliche Funktion als Transkriptionsfaktor und liegt zusammen mit der Kinase in einem Operon vor (Erni *et al.*, 2006). Laut einer bioinformatischen Analyse fehlen *S. aureus* jedoch die Gene zur Degradierung von Fettsäuren (Parsons *et al.*, 2011). Anhand einer metabolischen Untersuchung des *S. aureus* Stammes RN4220 wurde gezeigt, dass eine bestimmte Menge einer exogenen Fettsäure von den Bakterien aufgenommen wurde und vollständig in Form von Fettsäuren in den Zellen verblieb (Parsons *et al.*, 2011). Dennoch erscheint es fragwürdig, ob in allen *S. aureus* Stämmen diese Gene fehlen. Besitzt auch der für dieses Experiment verwendete *S. aureus* Stamm NCTC8325 keine Enzyme zum Fettabbau, ist es unwahrscheinlich, dass das hypothetische Protein SAOUHSC\_02659 die Funktion eines DHAK-Regulators in diesem Stamm hat. Möglicherweise hat es eine andere, bisher unbekannte Funktion. Aufgrund dessen kann keine Aussage getroffen werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Mutation in diesem putativen Regulator und der Wirkung von Stigmachronon 8 besteht.

Bislang konnte bei den Untersuchungen zum Wirkmechanismus und der Zielstruktur der Stigmate keine der aufgestellten Hypothesen bestätigt werden. Bei einem Vergleich der chemischen Struktur der Stigmate mit weiteren Sekundärmetaboliten, die von *S. erecta* produziert werden, können einige Übereinstimmungen im Grundgerüst beobachtet werden. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeiten könnten auch die Wirkungen der Sekundärmetabolite identisch oder zumindest ähnlich sein.

Strukturelle Ähnlichkeiten sind insbesondere zwischen Aurachin P, Stigmatellin und Stigmachronon zu beobachten, da es sich bei diesen Verbindungen um Polyketide mit einem aromatischen Ring und einer aus mindestens 8 Kohlenstoffatomen bestehenden Seitenkette handelt (Abb. 4.2; Höfle und Reichenbach, 1995; Höfle und Irschik, 2008). Ein Unterschied besteht darin, dass die Kohlenstoffketten von Aurachin P und Stigmatellin ungesättigt sind, wohingegen die Stigmate eine gesättigte Kette besitzen. Darüber hinaus haben die aromatischen Einheiten von allen Verbindungen unterschiedliche funktionelle Gruppen an verschiedenen Positionen, wobei einzig die Stigmate eine Nitro-Gruppe aufweisen.

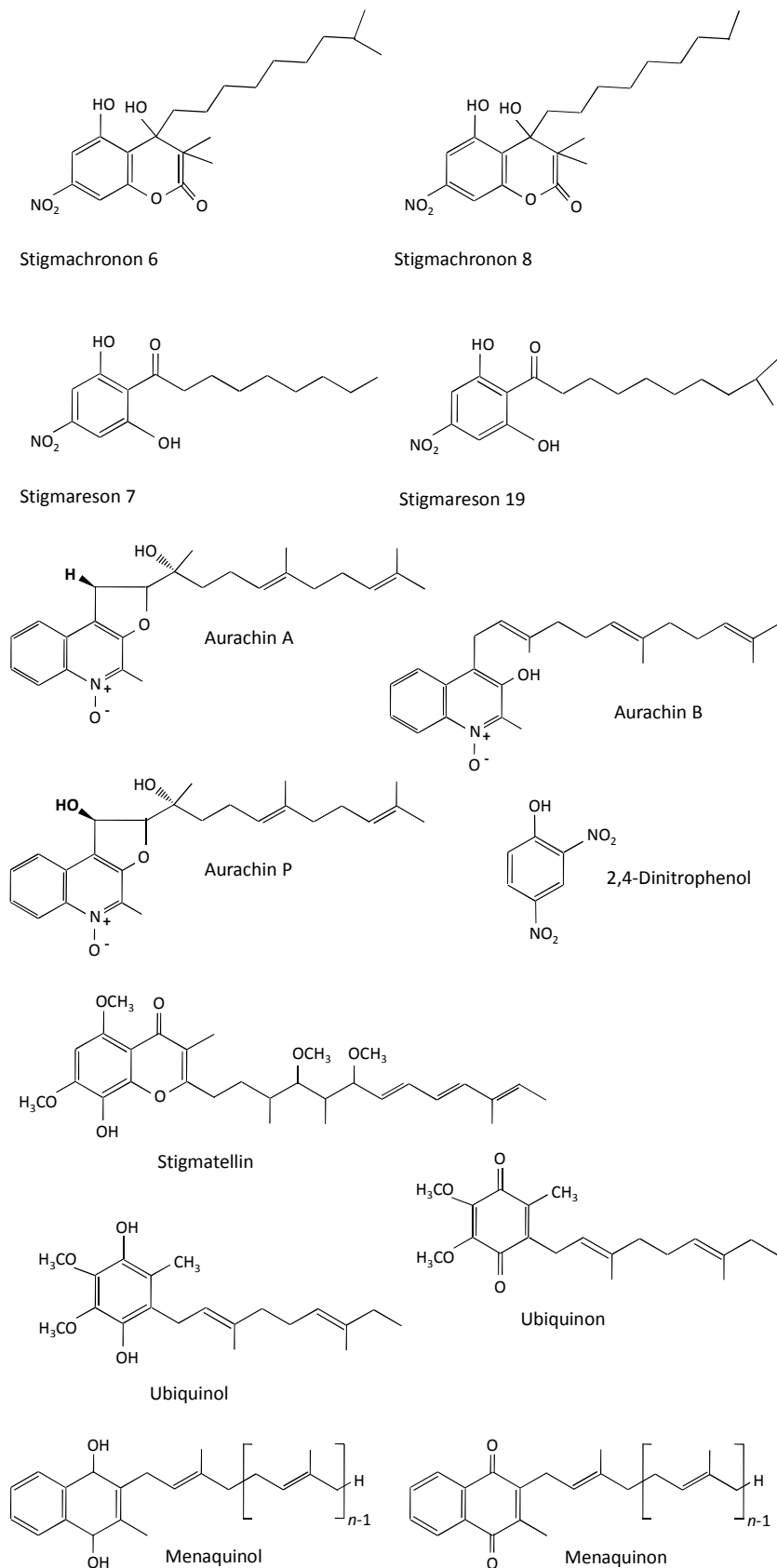


Abb. 4.2: Chemische Strukturen von Stigmachronon 6 und 8, Stigmareson 7 und 19, Stigmatellin, Ubiquinol, Ubiquinon, Menaquinon, Menaquinol sowie der Aurachine A, B und P und 2,4-Dinitrophenol (Kunze *et al.*, 1984; Kunze *et al.*, 1987; Höfle und Irschik, 2008).

Bei einer ersten Beurteilung der biologischen Wirkung wurde sowohl für die Aurachine als auch für Stigmatellin eine Inhibierung der NADH-Oxidation von eukaryotischen Mitochondrien beobachtet, die auf eine Hemmung des Elektronentransports der Atmungskette hindeutet (Thierbach *et al.*, 1984; Kunze *et al.*, 1987). Da die Stigmate eine Reduktion des MMPs hervorrufen, besteht die Möglichkeit, dass diese ebenfalls die Elektronentransportkette unterbrechen. Dies würde mit der Hypothese übereinstimmen, dass die Stigmate eine ähnliche Wirkung wie Aurachin oder Stigmatellin aufweisen.

Eine weitere Analyse zum Wirkmechanismus und der Zielstruktur von Stigmatellin ergab, dass dieses mit dem Komplex III der mitochondrialen Atmungskette interagiert (Thierbach *et al.*, 1984). Der Komplex III ist ein dimeres multi-Untereinheiten Enzym, das aus den drei hochkonservierten Kern-Einheiten Cytochrom b, einem Eisen-Schwefel Protein (ISP) mit einem Rieske [2Fe-2S] Cluster und Cytochrom  $c_1$  besteht (Abb. 4.3). Die Elektronen des Ubiquinols werden mithilfe des  $bc_1$  Komplexes über den Mechanismus des protonenmotorischen Q-Zyklus auf Cytochrom c übertragen. Dafür besitzt Cytochrom b zwei putative Quinon-Bindungsstellen (Kim *et al.*, 2012b). An der einen Bindungsstelle wird vermutlich Ubiquinol oxidiert ( $Q_o$ -Stelle), während an der zweiten Bindungsstelle Ubiquinon re-reduziert wird ( $Q_i$ -Stelle) (Lancaster *et al.*, 2007). Die Tasche, in der sich die  $Q_o$ -

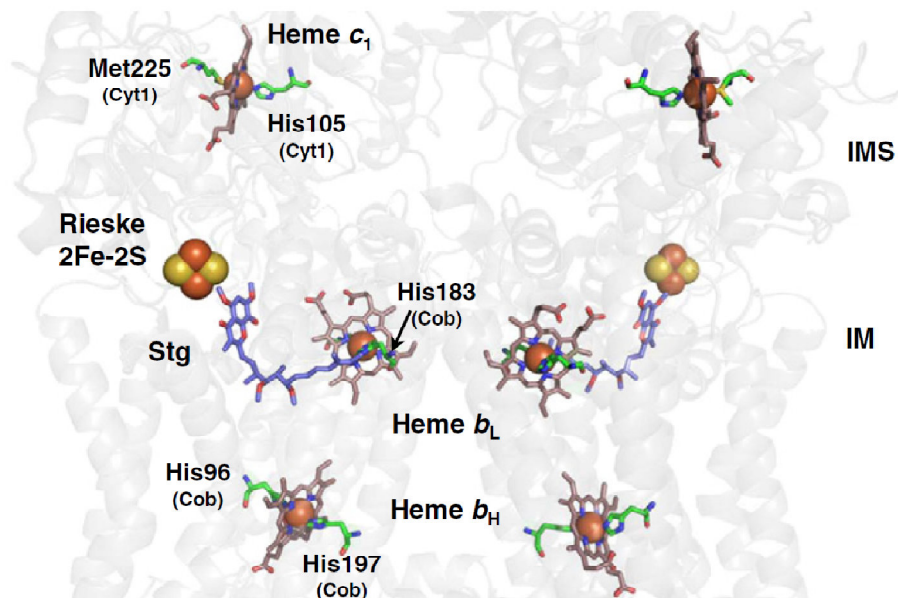


Abb. 4.3: Anordnung von Stigmatellin (Stg) an der  $Q_o$ -Bindungsstelle, sowie der Häme und des Eisen-Schwefel Proteins im dimeren  $bc_1$  Komplex der mitochondrialen Atmungskette. Die  $Q_i$ -Bindungsstelle ist nicht dargestellt. Die axialen Liganden zu den Häm-Eisen der Cytochrome sind mit entsprechender Aminosäure hervorgehoben. Cob: Di-Häm Cytochrom b; Cyt1: Cytochrom  $c_1$  Untereinheit (Kim *et al.*, 2012b).



Bindungsstelle befindet, bildet einen hydrophoben Hohlraum zwischen den beiden Untereinheiten des Dimers, während  $Q_i$  in der Nähe der Matrix lokalisiert ist (Gurung *et al.*, 2008).

Stigmatellin besitzt eine ähnliche Struktur wie Ubiquinol bzw. Ubiquinon (Abb. 4.2). Es wurde gezeigt, dass Stigmatellin an die  $Q_o$ -Stelle im Cytochrom b bindet und dadurch die Oxidation von Ubiquinol an der  $Q_o$ -Stelle verhindert, wodurch der Elektronentransfer von ISP zum Cytochrom c inhibiert wird (Abb.4.3; Thierbach *et al.*, 1984; von Jagow und Link, 1986; Esser *et al.*, 2004; Gurung *et al.*, 2008). Die Bindung von Stigmatellin an  $Q_o$  erfolgt über eine Wasserstoffbrücke zwischen der O8-Hydroxylgruppe von Stigmatellin und Glu272 (Esser *et al.*, 2004). Eine weitere Bindung geht Stigmatellin mit ISP ein, wobei vermutlich eine Wasserstoffbrücke zwischen His181 und der Keto-Gruppe von Stigmatellin ausgebildet wird (Abb. 4.4; Zhang *et al.*, 1999; Lancaster *et al.*, 2007). Die Konfiguration der Wasserstoffbrücken im  $bc_1$  Komplex zwischen Substrat und Ligand könnte für Stigmatellin und Quinon identisch sein (Crofts, 2004). Des Weiteren ist für die Bindung von Stigmatellin im  $bc_1$  Komplex ebenfalls die Kohlenstoffkette aufgrund ihrer Polarität ausschlaggebend, da sich die  $Q_o$ -Stelle in einem hydrophoben Bereich von Cytochrom b befindet. Es wurde nachgewiesen, dass eine verkürzte Seitenkette oder das Anfügen einer hydrophilen Gruppe zu dem Verlust der inhibitorischen Wirkung führt (Thierbach *et al.*, 1984).

Die Stigmate besitzen wie auch Stigmatellin außer einer hydrophoben Kohlenstoffkette mindestens eine Hydroxyl-Gruppe direkt an der aromatischen Einheit sowie eine Keto-Gruppe, die sich bei Stigmachronon 6 und 8 direkt am Aromaten und bei Stigmareson 7 und

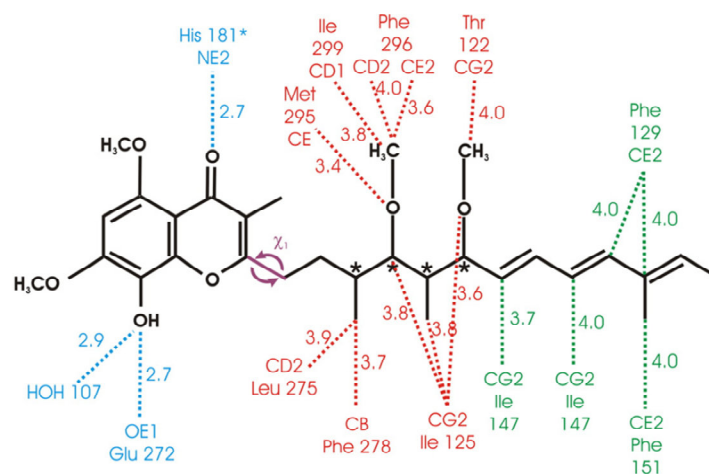


Abb. 4.4: Bindungsstellen von Stigmatellin mit dem Cytochrom  $bc_1$  Komplex von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Atome der Chromen-Kopfgruppe, die Wasserstoffbrücken ausbilden, sind in blau dargestellt. Die Keto-Gruppe interagiert mit dem Eisen-Schwefel Protein über His181. Die Hydroxyl-Gruppe interagiert mit der  $Q_o$ -Stelle über Glu272. Die rot und grün markierten Atome interagieren vermutlich mit Aminosäuren im hydrophoben Bereich der  $Q_o$ -Stelle (Lancaster *et al.*, 2007).

19 am ersten Kohlenstoff-Atom der Seitenkette befindet (Abb. 4.2). Mit diesen beiden Gruppen würde eine Bindung sowohl mit der Q<sub>o</sub>-Stelle als auch mit dem ISP des mitochondrialen bc<sub>1</sub> Komplexes auf die gleiche Weise möglich sein, wie es für Stigmatellin gezeigt werden konnte.

Gegen die Hypothese, dass die Bindung der Stigmate und Stigmatellin an den bc<sub>1</sub> Komplex identisch ist, spricht die Tatsache, dass sowohl die antibakterielle als auch die zytotoxische Wirkung von Stigmachronon 8 durch eine Substitution der Nitro-Gruppe aufgehoben wurde.

Daher ist anzunehmen, dass diese Gruppe in jedem Fall an der Interaktion mit der Zielstruktur beteiligt ist. So besteht die Möglichkeit, dass eine der zwei Bindungen nicht von einer Hydroxyl- oder Keto-Gruppe der Stigmate vermittelt wird, sondern stattdessen die Nitro-Gruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem mitochondrialen bc<sub>1</sub> Komplex ausbildet (Baitinger *et al.*, 1964).

Im Gegensatz zu den eukaryotischen Organismen besitzt Stigmatellin keine antibakterielle Wirkung auf *S. aureus* (Kunze *et al.*, 1984). Anstelle von Ubiquinon fungiert Menaquinon als Übermittler des Elektronentransfers in der Atmungskette von *S. aureus* (Abb. 4.2; Collins und Jones, 1981; Bentley und Meganathan, 1982). Möglicherweise ist dies die Ursache für die nicht vorhandene Wirkung von Stigmatellin. Strukturell weisen Ubiquinon und Menaquinon einige Unterschiede auf. So besteht der aromatische Teil von Ubiquinon aus einem Benzoquinon-Ring mit mehreren funktionellen Gruppen, wohingegen Menaquinon einen Naphthoquinon-Ring mit einer Methyl-Gruppe besitzt. Im Gegensatz zu Menaquinon verfügen Stigmatellin und Ubiquinon über zwei Methoxy-Gruppen. Eventuell spielen diese Methoxy-Gruppen eine Rolle dabei, warum Stigmatellin keine Wirkung auf *S. aureus* besitzt. Denkbar wäre, dass Stigmatellin aufgrund der zwei Methoxy-Gruppen in Verbindung mit dem Chromon-Ring wesentlich größer als Menaquinon ist und nicht in die Menaquinon-Bindungsstasche der respiratorischen Enzyme passt, wodurch keine Interaktion mit der Bindungsstelle zustande kommen würde. Die Stigmate besitzen im Gegensatz zu Stigmatellin keine Methoxy-Gruppe, sondern eine Nitro-, eine Keto- und zwei Hydroxy-Gruppen. Vermutlich sind die Stigmate daher kleiner als Stigmatellin und könnten in die Menaquinon-Bindungsstasche passen, wodurch eine Unterbrechung der bakteriellen Atmungskette möglich wäre.

Die Zielstruktur der Aurachine liegt ebenfalls innerhalb der Atmungskette, wobei die Aurachine A und B eine Inhibierung von Komplex I in Mitochondrien und in *E. coli* bewirken (Friedrich *et al.*, 1994). Im Vergleich zu den übrigen Komplexen der mitochondrialen Atmungskette ist zurzeit über Komplex I am wenigsten bekannt. So ist ungewiss, ob in

Komplex I eine oder zwei Bindungsstellen für Ubiquinon existieren und ebenso, wo die Bindungsstelle(n) lokalisiert sind. Der Elektronendonator von Ubiquinon ist das terminale Eisen-Schwefel Cluster N2, in dessen Nähe vermutlich eine Bindungsstelle liegen könnte (Verkhovskaya und Bloch, 2013). Indem Aurachin auf die katalytische Ubiquinon-Bindungsstelle von Komplex I wirkt, wird der Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel Cluster an Ubiquinon unterbrochen (Friedrich *et al.*, 1994). Jedoch ist für Aurachin, wie auch für die meisten anderen Komplex I-Inhibitoren, keine exakte Bindungsstelle bekannt. Stattdessen wird die Wirkung der Inhibitoren aufgrund der Blockierung der Ubiquinon-Reduktase-Aktivität und ihrer Konkurrenz mit Ubiquinon identifiziert (Verkhovskaya und Bloch, 2013).

Die Aurachine besitzen alle ein negativ geladenes Sauerstoff-Atom, das mit dem im Aromaten befindlichen Stickstoff verbunden ist. Möglicherweise könnte dieses Sauerstoff-Atom über eine Wasserstoffbrücke an einer Interaktion mit der putativen Quinon-Bindungsstelle von Komplex I beteiligt sein. Dadurch könnte die Bindung von Quinon an Komplex I inhibiert und somit der Elektronentransfer unterbrochen werden. Auch die Stigmaten weisen Sauerstoff-Atome mit einer negativen Ladung in Form der Nitro-Gruppe auf. Für den Fall, dass die Stigmaten eine Inhibierung von Komplex I hervorrufen, könnte diese Gruppe über eine Wasserstoffbrücke mit der Quinon-Bindungsstelle interagieren. Diese Theorie würde auch der Beobachtung entsprechen, dass die biologische Aktivität der Stigmaten auf deren Nitro-Gruppe beruht.

Außer einer kompetitiven Interaktion mit Quinon um einen Komplex der Atmungskette, der eine Hemmung der Elektronentransportkette zur Folge haben könnte, kann der beobachtete Effekt der Stigmaten auf das MMP von Säugetierzellen noch andere Ursachen haben.

Eine weitere Möglichkeit für eine geschädigte Zellatmung wäre eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Dabei finden die Redoxreaktionen weiterhin statt, aber der Protonengradient über die Membran kann nicht aufrecht erhalten werden und infolgedessen kann die Energieversorgung über die ATP-Synthase nicht erfolgen. Substanzen, die eine derartige Entkopplung auslösen, werden als Entkoppler bezeichnet und sind typischerweise schwache organische Säuren mit einer delokalisierten negativen Ladung und gleichzeitig hydrophoben Eigenschaften (Kadenbach, 2003). Die delokalisierte Ladung ermöglicht den Molekülen, sowohl im protonierten neutralen als auch im deprotonierten geladenen Zustand, Biomembranen zu überwinden (Kadenbach, 2003). Aufgrund dieser Eigenschaft werden diese Moleküle auch als Protonenionophoren bezeichnet. In der inneren Mitochondrienmembran ist der pH Wert aufgrund der ausgeschleusten Protonen sauer und der Entkoppler wird protoniert,

wohingegen die mitochondriale Matrix einen höheren pH Wert aufweist und der Entkoppler deprotoniert wird.

Durch die beständige Diffusion des protonierten und deprotonierten Entkopplers durch die Membran werden die ausgeschleusten Protonen in die Matrix zurücktransferiert und der Protonengradient wird abgebaut (Kadenbach, 2003). Indem die Ausschleusung der Protonen nicht mehr gegen einen elektrochemischen Gradienten stattfindet, laufen die Redoxreaktionen der Elektronentransportkette wesentlich schneller ab, wodurch sich der Sauerstoffverbrauch erhöht (Han *et al.*, 2008). Ein Beispiel für einen Entkoppler ist das Protonenionophor 2,4-Dinitrophenol (DNP; Abb. 4.2). DNP ist ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in Säugetierzellen und Bakterien, wie *S. aureus* (Loomis und Lipman, 1948; Hanstein, 1976; Dassý und Fournier, 1996; McFee *et al.*, 2004).

Die Stigmate weisen einige Merkmale auf, die auf eine Funktion als Entkoppler hindeuten. Zunächst besitzen die Stigmate sowohl hydrophobe Eigenschaften als auch eine delokalisierte negative Ladung aufgrund der Nitro-Gruppe, welche leicht protonierbar ist. Des Weiteren wurde für die Stigmate eine Reduktion des MMPs von Säugetierzellen nachgewiesen, welches durch DNP ebenso induziert wird (Dryer *et al.*, 1980; Kadenbach, 2003; Futakawa *et al.*, 2006). Darüberhinaus ist die Wirkung der Stigmate auf die A549 Zellen ebenso reversibel wie die Wirkung von DNP, wenn der Wirkstoff von den Zellen entfernt wird (Petrenko *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde eine verlangsamende Wirkung der Stigmate auf den Zellzyklus der A549 Zellen gezeigt. Parallel dazu induziert DNP einen Zellzyklusarrest von Calu-6 Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase (Han *et al.*, 2008).

Außer einer Funktion als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, besteht auch die Möglichkeit, dass die Stigmate eine zytotoxische Wirkung entfalten, indem sie mit Fe<sup>2+</sup> aus dem Medium Komplexe ausbilden und als Chelate vorliegen. Zum Beispiel könnten die Stigmat-Fe<sup>2+</sup> Komplexe die mitochondriale ATP-Synthase inhibieren, indem sie an deren  $\beta$ -Untereinheit binden. Eine solche Wirkung wurde für den Chelatkomplex Bathophenanthrolin-Fe<sup>2+</sup> nachgewiesen (Carlsson und Ernster, 1981; Hong und Pedersen, 2008). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Stigmat-Fe<sup>2+</sup> Komplexe wie das Chelat 1,10-Phenanthrolin-Ru<sup>2+</sup> wirken, welches das Zellwachstum von Krebszellen inhibiert. Dabei treten auch Effekte auf den Zellzyklus und das MMP auf (Tan *et al.*, 2011).

Auch wäre eine indirekte Wirkung von Stigmat-Fe<sup>2+</sup> Chelaten auf die Atmungskette denkbar. Einige Komplexe der Atmungskette besitzen Cytochrome mit Hämen als Co-Faktoren für den Elektronentransport (Gray und Winkler, 1996). Diese Häm-Einheit ist ebenfalls eine Komplexverbindung, denn sie besteht aus einem Porphyringerüst als Ligand und Fe<sup>2+</sup> als

Zentralatom. Die Stigmate könnten das freie Eisen im Medium komplexieren, welches dann nicht mehr den Säugetierzellen zur Bildung von Hämen zur Verfügung stehen würde. Ein Eisenmangel hätte vielfältige Auswirkungen auf eine Zelle, wie beispielsweise einen Kollaps des MMPs, oxidativen Stress und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welches die Apoptose induziert (Tsiftoglou *et al.*, 2006).

Die aufgestellten neuen Hypothesen basieren auf einem strukturellen Vergleich mit ähnlichen Verbindungen, deren Wirkungsweisen bekannt sind. Diese Theorien sollten durch verschiedene Untersuchungen überprüft werden. In der Annahme, dass die Nitro-Gruppe der Stigmate eine Rolle bei der biologischen Aktivität dieser Verbindungen spielt, sollte analysiert werden, ob reaktive Intermediate oder reaktive Stickstoffspezies wie NO in Säugetierzellen gebildet werden. Dies könnte auf eine Aktivität von Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen hindeuten.

Auch eine Fähigkeit der Stigmate zur Komplexbildung mit Metallen wäre denkbar. Würden die Stigmate beispielsweise mit freiem Eisen Chelate bilden, könnte dies anhand einer Bestimmung des verfügbaren Eisengehaltes im Medium festgestellt werden.

Des Weiteren sollte der Hypothese nachgegangen werden, inwiefern die Stigmate eine Hemmung der mitochondrialen und bakteriellen Atmung hervorrufen. Bisher wurde gezeigt, dass die Stigmate auf jeden Fall eine Reduktion des MMPs auslösen. Daher besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dieser Beobachtung nicht nur um einen sekundären Effekt handelt, sondern dass sich die Zielstruktur der Stigmate in der Atmungskette befindet. Hier wäre anzunehmen, dass die Stigmate, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Stigmatellin und Aurachin, mit einem der respiratorischen Komplexe interagieren und dadurch den Elektronentransport unterbrechen. Daher sollten Analysen zur Hemmung des Elektronentransports durchgeführt werden, bei denen Stigmatellin, Aurachin, Antimycin A und Rotenon als Kontrollen fungieren sollten. Beispielsweise könnte anhand der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies analysiert werden, ob die Stigmate die  $Q_o$ -Bindungsstelle von Komplex III hemmen. Denn es ist bekannt, dass Stigmatellin als  $Q_o$ -Stellen Inhibitor von Komplex III die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies verhindert (Armstrong *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu besitzen Rotenon als Komplex I-Inhibitor und Antimycin A als  $Q_i$ -Stellen Inhibitor von Komplex III diese Fähigkeit nicht (Armstrong *et al.*, 2003). Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass die Stigmate nicht als Hemmer sondern als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung agieren könnten. Somit sollte überprüft werden, ob die Stigmate so wie DNP einen erhöhten Sauerstoffverbrauch auslösen, der aufgrund von schneller ablaufenden Redoxreaktionen der Elektronentransportkette entsteht, da der

elektrochemische Gradient fehlt. Auch anhand eines Nachweises von ATP könnte diese Hypothese bewiesen werden, da eine Entkopplung die Produktion von ATP stark reduziert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stigmate für den Fall, dass sie eine Hemmung oder Entkopplung der Atmungskette induzieren, keinesfalls als Kandidaten für neue Antibiotika in Frage kommen. Dennoch bleibt es weiterhin interessant, die Zielstruktur und den Wirkmechanismus der Stigmate aufzuklären, da mithilfe der Stigmate eventuell Grundlagenforschung zur Atmungskette betrieben werden könnte. Dies ist beispielsweise für Stigmatellin der Fall, da diese Verbindung als Analog zu Ubiquinon/Ubiquinol eingesetzt wird, um neue Erkenntnisse über die  $Q_o$ -Bindungsstelle in Komplex III zu erhalten (Lancaster *et al.*, 2007; Armstrong *et al.*, 2003; Gurung *et al.*, 2008).

## Literaturverzeichnis

- Abraham E.P, and Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* 1940; 146, 837-837.
- Allen NE, Hobbs JN Jr, Richardson JM, Riggin RM. Biosynthesis of modified peptidoglycan precursors by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992 Nov 1;77(1-3):109-15.
- Amin ML. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights.* 2013 Aug 19;7:27-34.
- Armstrong JS, Whiteman M, Rose P, Jones DP. The Coenzyme Q10 analog decylubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition: role of mitochondrial [correction mitochondrial] complex III. *J Biol Chem.* 2003 Dec 5;278(49):49079-84.
- Ashihara, T. and Baserga, R. (1979) Cell synchronization. *Methods in Enzymology* 58: 248-262.
- Baitinger WF, Schleyer P von R, Murty TSSR, Robinson L. Nitro groups as proton acceptors in hydrogen bonding. *Tetrahedron*, Volume 20, Issue 7, 1964, Pages 1635-1647.
- Balibar CJ, Shen X, Tao J. The mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2009 Feb;191(3):851-61.
- Barber M, and Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by Penicillin-Resistant *Staphylococci*. *The Lancet*, Volume 252, Issue 6530, 23 October 1948, Pages 641-644.
- Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1973 Oct 15;54(4):1362-9.
- Bennis F, Favre G, Le Gaillard F, Soula G. Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int J Cancer.* 1993 Oct 21;55(4):640-5.
- Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev.* 1982 Sep;46(3):241-80.
- Benveniste R, and Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Aug;70(8):2276-80.
- Bereket W, Hemalatha K, Getenet B, Wondwossen T, Solomon A, Zeynudin A, Kannan S. Update on bacterial nosocomial infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Aug;16(8):1039-44.

- Bergmann S, and Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost.* 2007 Sep;98(3):512-20.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005 ;11 :127-52
- Billroth T. Untersuchungen über die Vegetationsformen von *Coccobacteria septica* und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten. Versuch einer wissenschaftlichen Kritik der versch. Methoden antisept. Wundbehandlung. Berlin, C. Reimer, 1874, 2°, XIV, 244 pp.
- Bismuth R, Zilhao R, Sakamoto H, Guesdon JL, Courvalin P. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Aug;34(8):1611-4.
- Blumenthal, H.J., 1972. Glucose catabolism in *Staphylococci*. In: Cohen, J.O. (Ed.), *Staphylococci*. Wiley-Interscience, New York, pp. 111-135.
- Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW. Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab.* 1999 Feb;66(2):122-7.
- Bondi, A Jr, and Dietz CC. Penicillin resistant staphylococci. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1945 Oct;60:55-8.
- Borisov VB, Gennis RB, Hemp J, Verkhovsky MI. The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1807(11):1398-413.
- Brown MH, Skurray RA. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001 Apr;3(2):163-70.
- Bush K, Sykes RB. beta-Lactamase inhibitors in perspective. *J Antimicrob Chemother.* 1983 Feb;11(2):97-107.
- Bynoe, ET, Elder, RH, Comtios, RD. Phage-typing and antibiotic-resistance of staphylococci isolated in a general hospital. *Can J Microbiol.* 1956 May;2(3):346-58.
- Cadness-Graves, B, Williams, R, Harper, GJ, Miles AA. Slide-Test for Coagulase-Positive *Staphylococci*. *The Lancet*, Volume 241, Issue 6250, 12 June 1943, Pages 736-738.
- Camenisch G, Folkers G, van de Waterbeemd H. Review of theoretical passive drug absorption models: historical background, recent developments and limitations. *Pharm Acta Helv.* 1996 Nov;71(5):309-27.
- Carling D, Zammit VA, Hardie DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* 1987 Nov 2;223(2):217-22.



- Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem.* 1989 Dec 8;186(1-2):129-36.
- Carlson CA, Kim KH. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem.* 1973 Jan 10;248(1):378-80.
- Carlsson C, Ernster L. Uncoupler-reversible inhibition of mitochondrial ATPase by metal chelates of bathophenanthroline. I. General features. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Dec 14;638(2):345-57.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Apr 15;328(2):309-16.
- Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol.* 2005 Jul;57 Suppl 1:189-204.
- Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders, AG. Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. *The Lancet*, Volume 236, Issue 6104, 24 August 1940, Pages 226-228.
- Chain E, and Duthie, ES. Bactericidal and Bacteriolytic Action of Penicillin on the *Staphylococcus*. *The Lancet*, Volume 245, Issue 6352, 26 May 1945, Pages 652-657.
- Chakrapani H, Kalathur RC, Maciag AE, Citro ML, Ji X, Keefer LK, Saavedra JE. Synthesis, mechanistic studies, and anti-proliferative activity of glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide prodrugs. *Bioorg Med Chem.* 2008 Nov 15;16(22):9764-71.
- Chalker AF, Ingraham KA, Lunsford RD, Bryant AP, Bryant J, Wallis NG, Broskey JP, Pearson SC, Holmes DJ. The *bacA* gene, which determines bacitracin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, is also required for virulence. *Microbiology.* 2000 Jul;146 ( Pt 7):1547-53.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK; Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *N Engl J Med* 2003; 348:1342-1347.
- Chen HW. Increase of latent HMG-CoA reductase activity with increasing density of cell cultures. *J Cell Physiol.* 1983 Oct;117(1):123-7.
- Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001 Dec;6(3):170-4.
- Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol.* 2002 Jan 31;35(1):116-26.

- Choi SH, Woo JH, Jeong JY, Kim NJ, Kim MN, Kim YS, Ryu J. Clinical significance of *Staphylococcus saprophyticus* identified on blood culture in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006 Nov;56(3):337-9.
- Chopra, I, Hawkey PM, and Hinton M. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* 29:245–277.
- Chopra I, and Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 Jun;65(2):232-60.
- Clarke PR, and Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J*. 1990 Aug;9(8):2439-46.
- Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun*. 2006 Aug;74(8):4950-3.
- Cohn, ZA, and Morse SI. Interactions between Rabbit Polymorphonuclear Leucocytes and *Staphylococci*. *J Exp Med*. 1959 September 1; 110(3): 419–443.
- Collins MD, and Jones D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev*. 1981 Jun;45(2):316-54.
- Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Dec;47(12):3675-81.
- Cowan ST. Classification of staphylococci by slide agglutination. *J. Path. Bact.*, Volume 48, Issue 1, January 1939, Pages: 169–173.
- Crofts AR. Proton-coupled electron transfer at the Qo-site of the bc1 complex controls the rate of ubiquinol oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Apr 12;1655(1-3):77-92.
- Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim M, Ploy MC, El Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K. Cell Wall Thickening Is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2003 January; 41(1): 5–14.
- Curtis AC and Kim KH. Regulation of Hepatic Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Phosphorylation and Dephosphorylation. *J. Biol. Chem*. 1973, 248:378-380.
- Darai G, Handermann M, Sonntag, HG, Zöller L (Hrsg.). *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*. Springer Verlag, ISBN 978-3-642-17157-4 . 4. Aufl. 2012.

- Darányi J, and Buzna D. Über die Verwendung von Staphylokokken bei Desinfektionsversuchen. *Medical Microbiology and Immunology*, ISSN 1432-1831, Vol. 105 (3/4. 1926), p. 560-563.
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Bedner E. Determining cell cycle stages by flow cytometry. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001 May;Chapter 8:Unit 8.4.
- Dassy B, and Fournier JM. Respiratory activity is essential for post-exponential-phase production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1996 Jul;64(7):2408-14.
- Dauchy S, Miller F, Couraud PO, Weaver RJ, Weksler B, Romero IA, Scherrmann JM, De Waziers I, Declèves X. Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2009 Mar 1;77(5):897-909.
- Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem*. 1994 Jul 15;223(2):351-7.
- Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett*. 1995 Dec 27;377(3):421-5.
- Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev*. 2000 Oct;24(4):403-27.
- De la Fuente R, Suarez G, Schleifer KH. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the Causal Agent of Abscess Disease of Sheep. *Internat. J. Syst. Bacteriol*. 35, 99-102 (1985).
- Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis*. 2005 Feb 15;40(4):562-73.
- Devereux TR, Risinger JI, Barrett JC. Mutations and altered expression of the human cancer genes: what they tell us about causes. *IARC Sci Publ*. 1999;(146):19-42.
- Devriese LA, Hájek V, Oeding P, Meyer SA, Schleifer KH. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Internat. J. Syst. Bacteriol*. 28, 482-490 (1978).
- Dewick PM. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep*. 2002 Apr;19(2):181-222.
- Dornbusch K, Hallander HO, Löfquist F. Extrachromosomal control of methicillin resistance and toxin production in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1969 May;98(2):351-8.

- Dryer SE, Dryer RL, Autor AP. Enhancement of mitochondrial, cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2,4-dinitrophenol. *J Biol Chem.* 1980 Feb 10;255(3):1054-7.
- Duncan RE, El-Sohemy A, Archer MC. Mevalonate promotes the growth of tumors derived from human cancer cells in vivo and stimulates proliferation in vitro with enhanced cyclin-dependent kinase-2 activity. *J Biol Chem.* 2004 Aug 6;279(32):33079-84.
- Earle WR, et al. Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 4: 165-212, 1943.
- Elsherbiny ME, and Brocks DR. The ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to alter physiological factors underlying drug disposition. *Drug Metab Rev.* 2011 Nov;43(4):457-75.
- Erni B, Siebold C, Christen S, Srinivas A, Oberholzer A, Baumann U. Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Apr;63(7-8):890-900.
- Esser L, Quinn B, Li YF, Zhang M, Elberry M, Yu L, Yu CA, Xia D. Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc(1) complex. *J Mol Biol.* 2004 Jul 30;341(1):281-302.
- Fehrenbacher N, Bar-Sagi D, Philips M. Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol.* 2009 Aug;3(4):297-307.
- Ferrand S, Tao J, Shen X, McGuire D, Schmid A, Glickman JF, Schopfer U. Screening for mevalonate biosynthetic pathway inhibitors using sensitized bacterial strains. *J Biomol Screen.* 2011 Jul;16(6):637-46.
- File TM Jr, Wilcox MH, Stein GE. Summary of ceftaroline fosamil clinical trial studies and clinical safety. *Clin Infect Dis.* 2012 Sep;55 Suppl 3:S173-80.
- Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* 1929 June; 10(3): 226–236.
- Florey HW. Use of Micro-organisms for Therapeutic Purposes. *Br Med J.* 1945 November 10; 2(4427): 635–642.
- Foster TJ, and Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 1998 Dec;6(12):484-8.
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res.* 1998 Sep 15;243(2):359-66.
- Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology* 3, 948-958 (December 2005).

- Foster TJ. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet Dermatol*. 2009 Oct;20(5-6):456-70.
- Freney J, Brun Y, Meugner H, Grimont F, Grimont PAD, Nervi C, Fleurette J. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., Two Species from Human Clinical Specimens. *Internat. J. Syst. Bacteriol*. 38, 168-172 (1988).
- Friedrich T, van Heek P, Leif H, Ohnishi T, Forche E, Kunze B, Jansen R, Trowitzsch-Kienast W, Höfle G, Reichenbach H, et al. Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). Relationship of one site with the ubiquinone-binding site of bacterial glucose:ubiquinone oxidoreductase. *Eur J Biochem*. 1994 Jan 15;219(1-2):691-8.
- Fuchs S, Pané-Farré J, Kohler C, Hecker M, Engelmann S. Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2007 Jun;189(11):4275-89.
- Futakawa N, Kondoh M, Ueda S, Higashimoto M, Takiguchi M, Suzuki S, Sato M. Involvement of oxidative stress in the synthesis of metallothionein induced by mitochondrial inhibitors. *Biol Pharm Bull*. 2006 Oct;29(10):2016-20.
- Gardner JF, and Lascelles J. The requirement for acetate of a streptomycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol*. 1962 Sep;29:157-64.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov;51(5):1417-23.
- Gibson DM, and Parker RA. 7 Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Reductase. (1987) In Boyer PD, and Krebs EG (eds). *The Enzymes*. Academic Press, New York, vol. 18, pp. 179-215.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec;62(4):1371-414.
- Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell*. 1985 May;41(1):249-58.
- Goldman RA, Hasan T, Hall CC, Strycharz WA, Barry S. Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. *Cooperman*. Jan 1, 1983; pp 359–368.
- Goldstein JL, and Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990 343, 425-430.

- Gossen M, and Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 15;89(12):5547-51.
- Gray HB, and Winkler JR. Electron transfer in proteins. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:537-61.
- Green DR, and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
- Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Sep;299(3):C539-48.
- Griffith RS, and Peck FB Jr (1956). Vancomycin, a new antibiotic: preliminary clinical and laboratory studies. In *Antibiotics Annual 1955-1956*, pp. 619-622. Medical Encyclopedia, Inc., New York.
- Griffith RS. Vancomycin use – an historical review. *J. Antimicrob. Chemother.* (1984) 14 (suppl D), pp. 1-5.
- Grkovic S, Brown MH, Roberts NJ, Paulsen IT, Skurray RA. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17;273(29):18665-73.
- Gurung B, Yu L, Yu CA. Stigmatellin induces reduction of iron-sulfur protein in the oxidized cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem*. 2008 Oct 17;283(42):28087-94.
- Gusarova GA, Dada LA, Kelly AM, Brodie C, Witters LA, Chandel NS, Sznajder JJ. Alpha1-AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K-ATPase endocytosis via direct phosphorylation of protein kinase C zeta. *Mol Cell Biol*. 2009 Jul;29(13):3455-64.
- Gut I, Danielová V, Holubová J, Soucek P, Klucková H. Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol*. 2000 Oct;74(8):437-46.
- Gwynn MN, Portnoy A, Rittenhouse SF, Payne DJ. Challenges of antibacterial discovery revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Dec;1213:5-19.
- Hammer ND, Reniere ML, Cassat JE, Zhang Y, Hirsch AO, Indriati Hood M, Skaar EP. Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host. *MBio*. 2013 Jul 30;4(4). pii: e00241-13.
- Hammond RK, White DC. Carotenoid formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1970 Jul;103(1):191-8.
- Han YH, Kim SW, Kim SH, Kim SZ, Park WH. 2,4-dinitrophenol induces G1 phase arrest and apoptosis in human pulmonary adenocarcinoma Calu-6 cells. *Toxicol In Vitro*. 2008 Apr;22(3):659-70.

- Hanstein WG. Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Sep 27;456(2):129-48.
- Hardie DG, and Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*. 1997 Jun 1;246(2):259-73.
- Hardie DG, Carling D, and Carlson M. THE AMP-ACTIVATED/SNF1PROTEIN KINASE SUBFAMILY:Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell? *Annu. Rev. Biochem*. 1998. 67:821–55.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol*. 2006 Jul 1;574(Pt 1):7-15.
- Hassan KA, Skurray RA, Brown MH. Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2007;12(3-4):180-96.
- Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes*. 1998 Aug;47(8):1369-73.
- Hengstenberg W, Egan JB, Morse ML. Carbohydrate transport in *Staphylococcus aureus*. VI. The nature of the derivatives accumulated. *J Biol Chem*. 1968 Apr 25;243(8):1881-5.
- Hillen W, Klock G, Kaffenberger I, Wray LV, Reznikoff WS. Purification of the TET repressor and TET operator from the transposon Tn10 and characterization of their interaction. *J Biol Chem*. 1982 Jun 10;257(11):6605-13.
- Hillen W, and Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*. 1994;48:345-69.
- Hinrichs W, Kisker C, Düvel M, Müller A, Tovar K, Hillen W, and Saenger, W. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* 264: 418–420, 1994.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Jul;40(1):135-6.
- Ho CH, Piotrowski J, Dixon SJ, Baryshnikova A, Costanzo M, Boone C. Combining functional genomics and chemical biology to identify targets of bioactive compounds. *Curr Opin Chem Biol*. 2011 Feb;15(1):66-78.
- Höfle G, and Reichenbach H. (1995) in *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen* (Kuhn, W, and Fiedler, HP, eds), pp 61-78, Attempto Verlag Tübingen GmbH, Tübingen.
- Höfle G, and Irschik H. Isolation and biosynthesis of aurachin P and 5-nitroresorcinol from *Stigmatella erecta*. *J Nat Prod*. 2008 Nov;71(11):1946-8.

- Holcapek M, Kolárová L, Nobilis M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem.* 2008 May;391(1):59-78.
- Holzgrabe U. Antibiotika: Neue Wirkstoffe in der Pipeline. *Pharmazeutische Zeitung* 20/2013.
- Hong S, Pedersen PL. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008 Dec;72(4):590-641.
- Hoshino T, Ikeda T, Tomizuka N, Furukawa K. Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pTHT15, a thermophilic *Bacillus* plasmid: comparison with staphylococcal TcR controls. *Gene.* 1985;37(1-3):131-8.
- Hou JP, and Poole JW.  $\beta$ -lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *J Pharm Sci.* 1971 Apr;60(4):503-32.
- Huang L, Perrault C, Coelho-Martins J, Hu C, Dulong C, Varna M, Liu J, Jin J, Soria C, Cazin L, Janin A, Li H, Varin R, Lu H. Induction of acquired drug resistance in endothelial cells and its involvement in anticancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2013 Jul 9;6(1):49.
- Hukkanen J, Lassila A, Päiväranta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, Pelkonen O, Raunio H. Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Mar;22(3):360-6.
- Igata M, Motoshima H, Tsuruzoe K, Kojima K, Matsumura T, Kondo T, Taguchi T, Nakamaru K, Yano M, Kukidome D, Matsumoto K, Toyonaga T, Asano T, Nishikawa T, Araki E. Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circ Res.* 2005 Oct 14;97(8):837-44.
- Igimi S, Kawamura S, Takahashi E, Mitsuoka T. *Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimen from cats. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* 39; 373-377 (1989).
- Igimi S, Takahashi E, Mitsuoka T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int J Syst Bacteriol.* 1990 Oct;40(4):409-11.
- Iwahana M, Utoguchi N, Mayumi T, Goryo M, Okada K. Drug resistance and P-glycoprotein expression in endothelial cells of newly formed capillaries induced by tumors. *Anticancer Res.* 1998 Jul-Aug;18(4C):2977-80.
- Jeacocke RE, Niven DF, Hamilton WA. The protonmotive force in *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.* 1972 Apr;127(3):57P-58P.
- Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *BMJ* 1961; 1: 124-125.



- Jormakka M, Byrne B, Iwata S. Protonmotive force generation by a redox loop mechanism. *FEBS Lett.* 2003 Jun 12;545(1):25-30.
- Jovetic S, Zhu Y, Marcone GL, Marinelli F, Tramper J.  $\beta$ -Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? *Trends Biotechnol.* 2010 Dec;28(12):596-604.
- Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 5;1604(2):77-94.
- Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev.* 2005 Feb;105(2):425-48.
- Kannenber EL, and Poralla K. (1999) Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* 86, 168-176.
- Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, van Denderen B, Jennings IG, Iseli T, Michell BJ, Witters LA. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans.* 2003 Feb;31(Pt 1):162-8.
- Kendall AI, Friedemann TE, Ishikawa M. 1930. Quantitative observations on the chemical activity of „resting“ *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 47:223-228.
- Khan SA, Novick RP. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 1983 Nov;10(3):251-9.
- Khan QA, Agarwal R, Seidel A, Frank H, Vousden KH, Dipple A. DNA adduct levels associated with p53 induction and delay of MCF-7 cells in S phase after exposure to benzo[g]chrysene dihydrodiol epoxide enantiomers. *Mol Carcinog.* 1998 Oct;23(2):115-20.
- Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 2012(a) Feb;15(1):92-9.
- Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta.* 2012(b) Sep;1823(9): 1604-16.
- Kirby WMM. Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant *Staphylococci*. *Science* 2 June 1944: 452-453.
- Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R; National Nosocomial Infections Surveillance System. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis.* 2006 Feb 1;42(3):389-91.

- Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol*. 1980;34:559-92.
- Klotchko A, Wallace MR, Licitra C, Sieger B. *Staphylococcus lugdunensis*: an emerging pathogen. *South Med J*. 2011 Jul;104(7):509-14.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Jul;10(3):505-20.
- Knudsen ET, Brown DM, Rolinson GN. A New Orally Effective Penicillinase-Stable Penicillin – BRL 1621. *The Lancet*, Volume 280, Issue 7257, 29 September 1962, Pages 632-634.
- Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jul;6(7):541-55.
- Koyama N, Inokoshi J, Tomoda H. Anti-infectious agents against MRSA. *Molecules*. 2012 Dec 24;18(1):204-24.
- Kralli A, Yamamoto KR. An FK506-sensitive transporter selectively decreases intracellular levels and potency of steroid hormones. *J Biol Chem*. 1996 Jul 19;271(29):17152-6.
- Krebs HA. 1937. Dismutation of pyruvic acid in *Gonococcus* and *Staphylococcus*. *Biochem. J*. 31: 661-671.
- Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*. 1995 Jul 21;270(29):17513-20.
- Kunze B, Kemmer T, Höfle G, Reichenbach H. Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984 May;37(5):454-61.
- Kunze B, Höfle G, Reichenbach H. The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987 Mar;40(3):258-65.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001 Apr 21;357(9264):1225-40.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-5, 1970.
- Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol*. 2002; 92 Suppl:46S-54S.
- Lancaster CR, Hunte C, Kelley J 3rd, Trumpower BL, Ditchfield R. A comparison of stigmatellin conformations, free and bound to the photosynthetic reaction center and the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *J Mol Biol*. 2007 Apr 20;368(1):197-208.
- Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol*. 2006;103(3):p97-106.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*. 2003 Mar 31;2(1):63-76.
- Levy SB, and McMurry L. Detection of an inducible membrane protein associated with R-factor-mediated tetracycline resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974 Feb 27;56(4):1060-8.
- Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 May;12(5):371-87.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976 Jan 15;17(1):62-70.
- Liscum L, Cummings RD, Anderson RG, DeMartino GN, Goldstein JL, Brown MS. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Dec;80(23):7165-9.
- Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*. 2005 Jul 18;202(2):209-15.
- Liu CI, Liu GY, Song Y, Yin F, Hensler ME, Jeng WY, Nizet V, Wang AH, Oldfield E. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science*. 2008 Mar 7;319(5868):1391-4.
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer, AW, Levine DP, Murray BE, Rybak MJ, Talan DA, and Chambers HF. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections in Adults and Children. *Clin. Infect. Dis*. 2011(a); 1-38.
- Liu JL, Mao Z, Gallick GE, Yung WK. AMPK/TSC2/mTOR-signaling intermediates are not necessary for LKB1-mediated nuclear retention of PTEN tumor suppressor. *Neuro Oncol*. 2011(b) Feb;13(2).

- Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*. 2003 Jan 15;36(Suppl 1):S11-23.
- Lo WT, and Wang CC. Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Neonatol*. 2011 Apr;52(2):59-65.
- Loeb, L. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J. med. Res*. 10, 407 (1903).
- Loomis WF, and Lipman F. Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation, *J. Biol. Chem*. 173 (1948) 807– 808.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998 Aug 20;339(8):520-32.
- Ma Y, Yang F, Wang Y, Du Z, Liu D, Guo H, Shen J, Peng H. CaMKK $\beta$  is involved in AMP-activated protein kinase activation by baicalin in LKB1 deficient cell lines. *PLoS One*. 2012;7(10).
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. 10th Edition, ISBNB 0-13-049147-0 (2003).
- Mah RA, Fung DY, Morse SA. Nutritional requirements of *Staphylococcus aureus* S-6. *Appl Microbiol*. 1967 Jul;15(4):866-70.
- McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J Innate Immun*. 2012;4(2):141-8.
- McFee RB, Caraccio TR, McGuigan MA, Reynolds SA, Bellanger P. Dying to be thin: a dinitrophenol related fatality. *Vet Hum Toxicol*. 2004 Oct;46(5):251-4.
- McMurry L, Petrucci RE Jr, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Jul;77(7):3974-7.
- Menzies BE. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Jun;16(3):225-9.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961 Jul 8;191:144-8.
- MMWR. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin - Japan, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:624-6.
- Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem*. 2006 Jun;97(6):1676-89.

- Much H. Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Zeitschr.* 14, 143 (1908).
- Nesin M, Svec P, Lupski JR, Godson GN, Kreiswirth B, Kornblum J, Projan SJ. Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Nov;34(11):2273-6.
- Niinivara FP, and Pohja MS. 1956. Über die Reifung der Rohwurst. I. Mitt.: Die Veränderung der Bakterienflora während der Reifung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 104:413-422.
- Norrby SR. The design of clinical trials with antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990 Jul;9(7):523-9. Review.
- Ogston A. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol.* 1882 Oct;17(Pt 1):24-58.
- Ohnoki, D, Suzue, G, Tanaka, S. D5-Phosphomevalonic acid as the intermediate of the enzymatic synthesis of bacterial phytoene. *J Biochem.* 1962 Dec;52:423-7.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis.* 2002 Mar;2(3):180-9.
- Orfanoudakis G, Zaoui D, Befort J, Bieth J. Cell cycle-specific variation of intracellular plasminogen activator activity in cultured human alveolar epithelial carcinoma and rat hepatoma cells. *Biology of the Cell*, 65 (1989) 297-300.
- Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins (Basel).* 2010 Aug;2(8):2117-31.
- Orth P, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol.* 2000 Mar;7(3):215-9.
- Pankey GA, and Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clin Infect Dis.* (2004) 38 (6): 864-870.
- Pariente CM. The role of multi-drug resistance p-glycoprotein in glucocorticoid function: studies in animals and relevance in humans. *Eur J Pharmacol.* 2008 Apr 7;583(2-3):263-71.
- Park YM, Anderson RL, Spitz DR, Hahn GM. Hypoxia and resistance to hydrogen peroxide confer resistance to tumor necrosis factor in murine L929 cells. *Radiat Res.* 1992 Aug;131(2):162-8.

- Parsons JB, Frank MW, Subramanian C, Saenkham P, Rock CO. Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 13;108(37):15378-83.
- Pasteur L. De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes. In: Pasteur Vallery-Radot Œuvres de Pasteur. Band 6: Maladies virulentes, virus-vaccins et prophylaxie de la rage. Masson, Paris 1933, S. 147–158. Ursprünglich veröffentlicht in Bulletin de l'Académie de médecine. Reihe 2, Band 9, 1880, S. 435–447.
- Perkins HR. Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin. *Biochem J*. 1969 Jan;111(2):195-205.
- Persidis A. Antibacterial and antifungal drug discovery. *Nat Biotechnol*. 1999 Nov;17(11):1141-2.
- Petrenko AY, Cherkashina DV, Somov AY, Tkacheva EN, Semenchenko OA, Lebedinsky AS, Fuller BJ. Reversible mitochondrial uncoupling in the cold phase during liver preservation/reperfusion reduces oxidative injury in the rat model. *Cryobiology*. 2010 Jun;60(3):293-300.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Apr 1;328(1):85-92.
- Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res*. 2010 Jul 1;16(13):3329-34.
- Qiu BY, Turner N, Li YY, Gu M, Huang MW, Wu F, Pang T, Nan FJ, Ye JM, Li JY, Li J. High-throughput assay for modulators of mitochondrial membrane potential identifies a novel compound with beneficial effects on db/db mice. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):256-65.
- Quesney-Huneus V, Wiley MH, Siperstein MD. Essential role for mevalonate synthesis in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Oct;76(10):5056-60.
- Relja B, Meder F, Wilhelm K, Henrich D, Marzi I, Lehnert M. Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells. *Int J Mol Med*. 2010 Nov;26(5):735-41.
- Rheinbaben K v, and Hadlok R. 1979. Gattungsdifferenzierung von Mikroorganismen der Familie Micrococcaceae aus Rohwürsten. *Fleischwirtschaft* 59:1321-1324.
- Richmond MH, Parker MT, Jevons MP, John M. High Penicillinase Production correlated with Multiple Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, Volume 283, Issue 7328, 8 February 1964, Pages 293-296.

- Rigsby RE, Fillgrove KL, Beihoffer LA, Armstrong RN. Fosfomycin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. *Methods Enzymol.* 2005;401:367-79.
- Rolinson GN, Batchelor FR, Stevens S, Wood JC, Chain EB. Bacteriological Studies on a new Penicillin – BRL. 1241. *The Lancet*, Volume 276, Issue 7150, 10 September 1960, Pages 564-567.
- Rosenbach FJ. *Mikro-organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen.* Wiesbaden J.F. Bergmann 1884.
- Rosenstein R, Nerz C, Biswas L, Resch A, Raddatz G, Schuster SC, Götz F. Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Feb;75(3):811-22.
- Rosenstein R, and Götz F. What distinguishes highly pathogenic staphylococci from medium- and non-pathogenic? *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;358:33-89.
- Rountree, PM, Freeman, BM. Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust.* 1955 Jul 30;42(5):157-61.
- Russell AD. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics and biocides. *Prog Med Chem.* 1998;35:133-97.
- Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J Hosp Infect.* 1999 Dec;43 Suppl:S57-68.
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M, Nomoto S, Trink B, Engles JM, Westra WH, Herman JG, Sidransky D. Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3659-62.
- Sanchez-Pescador R, Brown JT, Roberts M, Urdea MS. Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1218.
- Santos GS, Loureiro y Penha CV, Mattos-Guaraldi AL, Attias M, Lopes-Bezerra LM, Silva-Filho FC, Nagao PE. Group B *Streptococcus* induces tyrosine phosphorylation of annexin V and glutathione S-transferase in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2009 Sep;24(3):393-9.
- Sass P, Josten M, Famulla K, Schiffer G, Sahl HG, Hamoen L, Brötz-Oesterhelt H. Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Oct 18;108(42):17474-9.
- Sato R, Goldstein JL, Brown MS. Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 15;90(20):9261-5.

- Schenone M, Dančák V, Wagner BK, Clemons PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol.* 2013 Apr;9(4):232-40.
- Scherrer R, Gerhardt P. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *J Bacteriol.* 1971 Sep;107(3):718-35.
- Schleifer, K.H., Kloos, W.E. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *IJSEM Vol. 25 (1): 50-61 Jan. 1975.*
- Schleifer KH, and Fischer U. Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *IJSEM April 1982 vol. 32 no. 2 153-156.*
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R, Devriese LA. *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, 501-509 (1984).
- Schmitt W. Robert Koch; man and work (author's transl). *Zentralbl Chir.* 1982;107(5-6):251-9.
- Schwarz S, Cardoso M, Wegener HC. Nucleotide sequence and phylogeny of the tet(L) tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Mar;36(3):580-8.
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest.* 2004 Jan;113(2):274-84.
- Semenkov YP, Makarov EM, Makhno VI, Kirillov SV. Kinetic aspects of tetracycline action on the acceptor (A) site of *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Lett* 1982, 144 (1) pp. 125-129.
- Shaw C, Stitt JM, Cowan ST. Staphylococci and their classification. *J Gen Microbiol.* 1951 Nov;5(5 Suppl.):1010-23.
- Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3329-35.
- Sheldrick GM, Jones PG, Kennard O, Williams DH, Smith GA. Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature.* 1978 Jan 19;271(5642):223-5.
- Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006 Aug;21(4):257-76.



- Shittu AO, Lin J, Morrison D, Kolawole DO. The discovery of a multi-resistant *Staphylococcus haemolyticus* clone in the hospital and community environment in south western Nigeria. *Ostomy Wound Manage.* 2005 Jan;51(1):67-70.
- Sinha B, and Herrmann M. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost.* 2005 Aug;94(2):266-77.
- Singh RP, Kumar R, Kapur N. Molecular regulation of cholesterol biosynthesis: implications in carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2003;22(2):75-92.
- Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 1;88(9):3671-5.
- Smith, PK, Krohn, RI, Hermanson, GT, Mallia, AK, Gartner, FH, Provenzano, MD, Fujimoto, EK, Goeke, NM, Olson, BJ und Klenk, DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem*, Band 150(1):S. 76–85, 1985.
- Somerville GA, Chaussee MS, Morgan CI, Fitzgerald JR, Dorward DW, Reitzer LJ, Musser JM. *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infect Immun.* 2002 Nov;70(11):6373-82.
- Somerville GA, Saïd-Salim B, Wickman JM, Raffel SJ, Kreiswirth BN, Musser JM. Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: implications for host-pathogen interactions. *Infect Immun.* 2003 Aug;71(8):4724-32.
- Srivalli KMR, and Lakshmi PK. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Braz J Pharm Sci.* 2012;48(3):353–67.
- Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog.* 2002;85(Pt 1):57-72.
- Su YA, He P, Clewell DB. Characterization of the tet(M) determinant of Tn916: evidence for regulation by transcription attenuation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Apr;36(4):769-78.
- Suarez G, and Nathans D. 1965. Inhibition of aminoacyl-sRNA binding to ribosomes by tetracycline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18:743–750.
- Sykes R. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Sep;65(9):1842-52.
- Tan C, Wu S, Lai S, Wang M, Chen Y, Zhou L, Zhu Y, Lian W, Peng W, Ji L, Xu A. Synthesis, structures, cellular uptake and apoptosis-inducing properties of highly cytotoxic ruthenium-Norharman complexes. *Dalton Trans.* 2011 Sep 14;40(34):8611-21.

- Tenover FC, Sinner SW, Segal RE, Huang V, Alexandre SS, McGowan JE Jr, Weinstein MP. Characterisation of a *Staphylococcus aureus* strain with progressive loss of susceptibility to vancomycin and daptomycin during therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Jun;33(6):564-8.
- Thierbach G, Kunze B, Reichenbach H, Höfle G. The mode of action of stigmatellin, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim et Biophys Acta - Bioenergetics*, Volume 765, Issue 2, 29 May 1984, Pages 227-235.
- Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1965 Oct;54(4):1133-41.
- Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther*. 2006 Aug;111(2):327-45.
- Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001 Jul 21;358(9277):207-8.
- Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, Löffler B. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis*. 2010 Oct 1;202(7):1031-40.
- Tynecka Z, Szcześniak Z, Malm A, Los R. Energy conservation in aerobically grown *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol*. 1999 Oct;150(8):555-66.
- Ubukata, K., Nonoguchi, R., Matsushashi, M., and Konno, M. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol*. 1989 May; 171(5): 2882–2885.
- Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Sep;28(3):397-403.
- Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Struelens MJ, Tulkens PM. The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Mar;29(3):124-34.
- Verkhovskaya M, and Bloch DA. Energy-converting respiratory Complex I: on the way to the molecular mechanism of the proton pump. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Feb;45(2):491-511.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):131-49.
- von Jagow, G, and Link TA. Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc1 complex. *Methods Enzymol*. 1986;126:253-71.

- Vuillemin P. Antibioses et symbiose. *Compte rendu de l'Association française pour l'avancement des sciences*, Pt. 2, 1889 (publ. 1890), 18:525-543.
- Vuong C, and Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 2002 Apr;4(4):481-9.
- Wang CH, Wu HT, Cheng HM, Yen TJ, Lu IH, Chang HC, Jao SC, Shing TK, Li WS. Inhibition of glutathione S-transferase M1 by new gabosine analogues is essential for overcoming cisplatin resistance in lung cancer cells. *J Med Chem.* 2011 Dec 22;54(24):8574-81.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 2003 Nov 28;302(5650):1569-71.
- Weissman KJ, and Müller R. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg Med Chem.* 2009 Mar 15;17(6):2121-36.
- Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN. Identification, Evolution, and Essentiality of the Mevalonate Pathway for Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis in Gram-Positive Cocci. *J Bacteriol.* 2000(a) August; 182(15): 4319–4327.
- Wilding EI, Kim DY, Bryant AP, Gwynn MN, Lunsford RD, McDevitt D, Myers JE Jr, Rosenberg M, Sylvester D, Stauffacher CV, Rodwell VW. Essentiality, expression, and characterization of the class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000(b) Sep;182(18):5147-52.
- Williams JRB, Talbot ECS, and Maughan E. Hospital Outbreak of Cross-infection Due to *Staphylococcus Pyogenes* Phage Type 80. *Br Med J.* 1959 May 30; 1(5134): 1374–1378.
- Winslow CE, and Winslow A. *The Systematic Relationships of the Coccaceae*. Wiley, New York 1908.
- Witte W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect Genet Evol.* 2004 Sep;4(3):187-91.
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 2003 Nov 11;13(22):2004-8.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2005 Jul;2(1):21-33.
- Xia G, Kohler T, Peschel A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2010 Feb;300(2-3):148-54.

- Xia S, Yu S, Yuan X. Effects of hypoxia on expression of P-gp and multidrug resistance protein in human lung adenocarcinoma A549 cell line. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2005;25(3):279-81.
- Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2007 Sep 27;449(7161):496-500.
- Yamaguchi A, Ono N, Akasaka T, Noumi T, Sawai T. Metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. The role of the conserved dipeptide, Ser65-Asp66, in tetracycline transport. *J Biol Chem*. 1990(a) Sep 15;265(26):15525-30.
- Yamaguchi A, Udagawa T, Sawai T. Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *J Biol Chem*. 1990(b) Mar 25;265(9):4809-13.
- Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin Oncol*. 1992 Jun;19(3 Suppl 9):1-10.
- Zak O, Mett H, O'Reilly T. Remarks on the screening of antibiotics for antibacterial activity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990 Jul;9(7):462-5.
- Zamboni N, Sauer U. Knockout of the high-coupling cytochrome aa3 oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Sep 12;226(1):121-6.
- Zervosen A, Sauvage E, Frère JM, Charlier P, Luxen A. Development of new drugs for an old target: the penicillin binding proteins. *Molecules*. 2012 Oct 24;17(11):12478-505.
- Zhang L, Snyder C, Trumpower BL, Yu L, Yu CA. Determination of the binding rate constants of stigmatellin and UHDBT to bovine cytochrome bc(1) complex by cytochrome c(1) oxidation. *FEBS Lett*. 1999 Oct 29;460(2):349-52.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1167-74.
- Zhou R, Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Induction of a reversible, non-cytotoxic S-phase delay by resveratrol: implications for a mechanism of lifespan prolongation and cancer protection. *Br J Pharmacol*. 2009 Sep;158(2):462-74.

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
a	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC Transporter	ATP-Bindungskassette (engl. ATP-Binding Cassette)
Abt.	Abteilung
AcCoA	Acetyl-CoA
ADEP	Acyldepsipeptid
AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid)
BD	Becton Dickinson
BISA	Biologische Systemanalyse
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
c	Cytosin
ca.	circa
CaMKKβ	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase-Kinase
CAS	Chemical Abstracts Service
CBIO	Chemische Biologie
CFU	Kolonie-bildende Einheit (engl. colony forming unit)
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
CYP	Cytochrom P450
d	Tag (engl. day)
d.h.	das heißt

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHAK	Dihydroxyacetonkinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	2,4-Dinitrophenol
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eap	Extrazelluläres Adhärenzprotein
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz (engl. enhanced chemoluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-G	Elongationsfaktor G
EGM-2	Endothelwachstumsmedium-2 (engl. endothelial growth medium-2)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunnachweis (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
Em	Abgabe (engl. emission)
et al.	und andere
Ex	Anregung (engl. excitation)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Sortierung von Zellen (engl. fluorescence activated cell sorting)
FBS	fötales Rinderserum (engl. fetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter)
FtsZ	Filamenting temperature sensitive mutant Z
g	Guanin
g	Gramm
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase	Gap <sub>0</sub> /Gap <sub>1</sub> -Phase
G <sub>2</sub> /M-Phase	Gap <sub>2</sub> /Mitose-Phase
GMAK	Genomanalytik
GTPasen	Guanosintriphosphatase
xg	relative Zentrifugalkraft
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
H <sub>2</sub> O	Dihydrogenmonooxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (engl. high performance liquid chromatography-mass spectrometry)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horse radish peroxidase)
HTH	Helix-turn-helix
HUVEC	Humane Nabelschnur-Endothel Zellen (engl. human umbilical vein endothelial cells)
HyU	Hydroxyurea
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IC <sub>50</sub>	Konzentration mit halbmaximalem inhibitorischen Effekt
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IgG	Immunglobulin G
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat

ISP	Eisen-Schwefel Protein (engl. iron sulfur protein)
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin
	Iodid
k	Kilo
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
Leu	Leucin
LKB1	Leberkinase B1
M	Mol pro Liter
m	Meter
M-Phase	Mitose-Phase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (engl. mitogen activated protein kinase)
max.	maximal
MCH	Medizinische Chemie
Mbp	Megabasenpaare
MeOH	Methanol
Mev	Mevalonat
MFS	Haupt-Vermittler Überfamilie ( engl. major facilitator superfamily)
mg	Milligramm
MIC	Minimale inhibitorische Konzentration (engl. minimal inhibitory concentration)
min.	mindestens
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Mitochondriales Membranpotential
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
MRSA	Methicillin/ Multi-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
MSCRAMM	Mikrobielle Oberflächenkomponenten-erkennende Adhäsionsmatrixmoleküle (engl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid
MWIS	Mikrobielle Wirkstoffe
N	Stickstoff
n	Nano
n.d.	nicht detektiert
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dinatriumhydrogencarbonat
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures

NCTC 8325-Sc8-R	Stigmachronon 8 resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonooxid
nt	Nukleotid
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
P-Glykoprotein	Phospho-Glykoprotein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	Penicillin-bindende Proteine
PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PI	Propidiumiodid
PMF	elektrochemischer Protonengradient (engl. proton motive force)
POD	Peroxidase
PP	Diphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
Pyr	Pyruvat
®	registriert
RBS	Ribosombindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>
<i>S. felis</i>	<i>Staphylococcus felis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>S. schleiferi</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
<i>S. aurantiaca</i>	<i>Stigmatella aurantiaca</i>
<i>S. erecta</i>	<i>Stigmatella erecta</i>
S-Phase	Synthese-Phase
Sc8	Stigmachronon 8
SCC	Staphylokokken Chromosomale Kassette (engl. staphylococcal chromosomal cassette)
SCV	Langsam wachsende Subpopulation (engl. small colony variant)



SDS	Natriumdodecylsulfat
Sr19	Stigmareson 19
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. small nucleotide polymorphism)
Sim	Simvastatin
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. sidescatter)
Subsp.	Subspezies
t	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. tris buffered saline)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung-Tween (engl. tris buffered saline-tween)
TCA	Trikarbonsäure
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tetrazyklin Repressor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS
Thr	Threonin
TM	Handelszeichen (engl. trade mark)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tRNA	transfer Ribonukleinsäure (engl. transfer ribonucleic acid)
TSB	Trypton Soja Bouillon
TSS	Toxisches Schocksyndrom (engl. toxic shock syndrome)
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v; Vol.	Volumen
w/o	ohne (engl. without)
z. B.	zum Beispiel

## Anhang B

### Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
$\alpha$ -Ketoglutarat	Boehringer	127205
Acetyl-CoA NatriumSalz	Sigma Aldrich	A2056
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth	3029.1
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth	9592.3
Anti-Bleich Lösung	AppliChem	APPA4619,0001
Bacto™ Agar	Becton Dickinson	214010
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M7522
Bicinchoninsäure Dinatriumsalz	Sigma Aldrich	D8284
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich	A7906
Celite® 535	Sigma Aldrich	22138
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Th. Geyer	APPA1935/000100
Compound C	Sigma Aldrich	P5499
Dihydroxyacetonphosphat Lithiumsalz	Sigma	D7137
Dimethylsulfoxid	Biozol	EMR385250
Dinatriumcarbonat	Riedel-de Haën	31432
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth	P030.1
Dinatriumsulfat, anhydriert	Carl Roth	8631.2
Dinatriumtartrat	Carl Roth	0254.1
DMEM	Lonza	BE12-741F
EGM-2	Lonza	CC-3162
Essigsäureanhydrid	Sigma Aldrich	539996
Essigsäure Rotipuran® 100 %	Carl Roth	3738.5
Ethanol	J. T. Baker	8006
Ethylendiamintetraacetat	Riedel-de Haën	27270
FBS	Lonza	DE14-801F
Fruktose-6-phosphat	Sigma Aldrich	F3627
Fruktose-1,6-biphosphat	Sigma Aldrich	F6803
Fumarsäure Dinatriumsalz	Merck	820584
D(+)-Glukose Monohydrat	Riedel-de Haën	16301
Glukose-6-phosphat	Sigma Aldrich	G7250
Glycin Pufferan®	Carl Roth	3908.2
Glycerin 87 %	Merck	1.04094.
HCl 32 %	Carl Roth	X896.1
Hydroxyurea	Sigma Aldrich	H8627
Kaliumchlorid	Merck	4936
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	4873
Kupfersulfat	Fluka	61240
Isopropanol	J. T. Baker	8067
Laemmli Puffer, 2x	BioRad	161-0737
Lysozym	Sigma Aldrich	62971
Metformin	Sigma Aldrich	D150959
Methanol	J. T. Baker	8067
Methicillin Natriumsalz	Sigma Aldrich	51454
Mevalonat Lithiumsalz	Sigma Aldrich	50838
Milchpulver	Euroclone S.p.A.	EMR 180500

MTT	Sigma Aldrich	M2128
Müller Hinton Medium	Carl Roth	X927.1
Natriumacetat	Roth	6773.2
Natriumchlorid	Carl Roth	3957.1
Natriumdodecylsulfat	Fluka	71725
(L)-Natriumglutamat	Sigma Aldrich	49621
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth	0965.2
Natriumpyruvat	AppliChem	APPA4859,0100
Palladium-Kohlenstoff Katalysator	Sigma Aldrich	205699
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth	A156.3
Phosphoenolpyruvat	Sigma Aldrich	P7127
Phosphoglycerinsäure	Sigma Aldrich	P8877
PhosStop (Phosphatase Inhibitor)	Roche	04906837001
Propidiumiodid	Sigma Aldrich	81845
Protease Inhibitor Complete Mini	Roche	04693124001
Proteinase K	Qiagen	19131
Pyridin, anhydriert	Sigma Aldrich	270970
ReBlot Plus Antibody Stripping Solution, 10x	Millipore	2504
RPMI 1640	Lonza	BE12-702F
RNAse (Ribonuclease A bovine pancreas)	Sigma Aldrich	R4875
Simvastatin	Sigma Aldrich	S6196
Trizma® Succinat	Sigma Aldrich	T9632
N'-N'-Tetramethylethylendiamin	Merck	8920
Tetrazyklin	Sigma Aldrich	87128
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Merck	6448
Tris Base	Sigma Aldrich	T1503
Triton X-100	Carl Roth	3051.3
Trypsin-EDTA	Lonza	BE17-161E
Trypsin Neutralisierungslösung	Lonza	CC-5002
Trypton Soja Medium	Sigma Aldrich	22092 Fluka
Tween®-20	Serva	37470.01

## Anhang C

### Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten	µQuant, BioTek
Blotapparatur	BioScreen C MBR, Growth Curves USA
Blotdokumentation	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad
Brucheisautomat	LAS-3000, Fujifilm
Brutschränke	Ziegra
Bunsenbrenner	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero, Heraeus; HerCell 150i, Thermo Scientific
Dampfsterilisatoren	Fireboy, Heraeus
Durchflusszytometer	Belimed Infection Control; Sauter 464; Zirbus HST 4-5-6
Elektrophoresehalterung für Proteingele	Canto, BD Bioscience
Elektrophoreseapparatur für Proteingele	Criterion™ Kassette, BioRad
Fluoreszenzmessgerät für Mikrotiterplatten	CriterionCell, BioRad
Kolbenschüttler	Synergy™ 4, Biotek; Victor 3, Perkin Elmer
Kulturkolben	Multitron, Infors-HAT
Magnetrührer	Duran ® Erlenmeyerform, aus Glas
Mikrodismembrator	Größe 100 ml 5010472; 1000 ml 5010477
Mikroskope	MR 2002, Heidolph
Mikroskopfilter	Mikro-Dismembrator U, B. Braun Biotech International
Mikroskopkamera	CKX41/U-RFLT50, Olympus; Axioplan, Carl Zeiss
Mikrotiterplattenschüttler	ET-Texas Red Filterset F46-008; AHF Analysentechnik
Multikanalpipetten	Color View SIS FireWire Camera 3.0; AxioCamMRm, Carl Zeiss
Netzgeräte	Titramax 1000, Heidolph; Comfort 5355R, Eppendorf
pH-Meter	Transferpette®-12 electronic:
Pipetten	0,5-10 µl; 5-100 µl; 15-300 µl, Brand
	Transferpette®-8 electronic:
	1-20 µl; 5-100 µl, Brand
	Transferpette® S-810-100 µl, Brand
	Research Mehrkanal 10-100 µl, Eppendorf
	Power Pack 1000, BioRad
	pH 211 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments
	Research 0,1-2,5 µl, Eppendorf
	Research 0,5-10 µl, Eppendorf
	Research 2-20 µl, Eppendorf
	Research 100-1000 µl, Eppendorf
Pipettierhilfen	Easypet®, Eppendorf; CellMate Matrix, Thermo Scientific
Rotoren	Ausschwingrotor A-4-44, Eppendorf
	Festwinkelrotor F-34-6-38, Eppendorf
	Deepwell-Plattenrotor A-2-DWP, Eppendorf
Schütteltisch	Innova 2100, New Brunswick Scientific
Spektralphotometer	NanoDrop 1000, Peqlab

---

Sterilwerkbänke	HeraSafe KS12, Thermo Scientific MaxiSafe 2020, Thermo Scientific
Vakuumpumpe	XF54 230 50, Millipore
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries; IKA Works Vortexer
Waagen	PC4400, Mettler Sartorius excellence Sartorius research
Wärmeschränk	Memmert UK 400
Wasseraufreinigung	Reinstwassersystem Milli-Q Academic A10, Millipore
Wasserbäder	Schüttelwasserbad 3047, Köttermann; Wbn 14, Memmert
Wippschüttler	TECNO MARA Rockomat; WS5, Edmund Bühler
Zählkammer	Neubauer <i>improved</i> , Assistent Germany Zählkammer Neubauer improved mit Sondertiefe 0,01mm
Zentrifugen	5804R, Eppendorf; 5415 C, Eppendorf; 5415 R, Eppendorf

---

## Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Antibiotika-Testblättchen	6 mm 2668, Schleicher und Schuell
Deckgläschen	20x26 mm für Neubauer <i>improved</i> Zählkammer, Menzel rund Ø12 mm 5161064, Menzel
Einmalspritzen	2 ml Omnifix, Luer Lock, 3201218, Fisher Scientific 5 ml steril 5410005 Wolf Henke-Sass
Einwegpipetten	Costar Stripette 5 ml (4487), 10 ml (4488), 25 ml (4489), Corning
FACS Röhrchen	5 ml 75x12 mm 551579, Sarstedt
Filterpapier	Extra-dickes Filterpapier 1703960, BioRad
Glasskugeln 5 mm	Z143944, Sigma Aldrich
Membran	Immunoblot PVDF Membran 162-077, BioRad
Multiwellplatten	6 well-Platten 657160, Greiner Bio-One 24 well-Platten 662160, Greiner Bio-One CytoOne 96 well-Plate CC7682-7596, Starlab Nunc MicroWell 96-Well Optical-Bottom Plates, 165305 Thermo Scientific Honeycomb 2 plate 9502550, iLF bioserve
Objektträger	76x22 mm Menzel Gläser Superfrost® AA00008032E, Thermo Scientific
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 0,5 ml 0030 121.023, Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml 0030 120.086, Eppendorf Safe-Lock Tubes 2 ml 0030 120.094, Eppendorf Lysing Matrix B tubes 116911100, MP Biomedicals
Kryoröhrchen	Nalgene® Cryoware™ 5000-0020, Nalgene Nunc Int.
Pasteurpipetten	ausGlas 747720, Brand
Petrischalen	Polystyrol, 94x16 mm rund 5408047, Omnilab
Pipettenspitzen	TipOne® S1111-3000 10 µl TipOne® S1111-0006 200 µl TipOne® S1111-2021 1000 µl PLASTIBRAND® 5-300 µl, 5409196 PLASTIBRAND® 0,5-20 µl, 5409208
Spritzenfilter	für HPLC-Proben 0,2 µm AFO320352, Phenomenex
Sterilfilter	Minisart 0,2 µm 17573, Sartorius Bottletop 500 ml Filter 0,2 µm 595-4520, Nalgene
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> CE48.1, Roth 75 cm <sup>2</sup> 430641, Corning 175 cm <sup>2</sup> 660175, Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen	15 ml 430829, 50 ml 430791, 50 ml 430897, Corning

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Ursula Bilitewski bedanken, die mir diese Dissertation ermöglicht hat. Während der ganzen Zeit waren mir ihre freundliche Betreuung, ihr fundiertes Wissen und ihre kompetente Anleitung zur wissenschaftlichen Methodik eine sehr große Hilfe.

Ebenso herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Ludger Beerhues für die freundliche Übernahme des Korreferats und den damit verbundenen Mühen danken. Mein Dank gilt des Weiteren Herrn Prof. Dr. André Fleißner für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Disputation. Auch möchte ich mich bei Dr. Eva Medina, Dr. Maximiliano Gutierrez und Dr. Florenz Sasse für ihre Ratschläge im Thesis Committee bedanken. Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Florenz Sasse, Dr. Rolf Jansen, Bettina Hinkelmann und Kerstin Schober für die Bereitstellung der myxobakteriellen Sekundärmetabolite bedanken, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Darüberhinaus danke ich Dr. Werner Tegge für die Bereitstellung der *S. aureus* Stämme.

Dr. Raimo Franke, Aruna Raja sowie Dr. Yazh Muthukumar gilt mein Dank für die experimentellen und theoretischen Hilfestellungen, Dr. Evgeny Prusov für die Bereitstellung der Stigmachronon 8 Derivate und Dr. Lothar Gröbe für die nette Unterstützung bei der Aufnahme und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten. Auch vielen Dank an Steffen Bernecker für seine Hilfe bei der Analyse der HPLC Daten.

Und natürlich möchte ich der ganzen BiSA Arbeitsgruppe danken, für die gegenseitige Unterstützung, für die nette Arbeitsatmosphäre und die kurzweiligen Mittagspausen. Insbesondere danke ich auch meinen ehemaligen Büro-Kollegen Anna, Shuna und Rabeay für die nette Zeit miteinander. Und vielen Dank auch an meine Freundin Diana für ihre Ratschläge bei allen möglichen Problemen.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern. Sie haben mir meine Ausbildung ermöglicht, mich immer unterstützt und an mich geglaubt. Und zum Schluss möchte ich meinem Freund Ewald danken, für seine Geduld, seine Hilfe bei widerspenstigen Computern und dass er immer für mich da ist.